

---

# **Molekulare Epidemiologie von Gruppe A Streptokokken aus Indien**

—

## **Untersuchung von phänotypischen und genotypischen Merkmalen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von René Bergmann  
aus Sangerhausen

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Privatdozent Dr. Manfred Rohde

Professor Dr. Michael Steinert

30.06.2010

28.09.2010

Druckjahr 2011

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Streptococcus pyogenes – Gruppe A Streptokokken .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Virulenzfaktoren von Streptococcus pyogenes .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Das M Protein.....	7
2.2.1.1 Einführung in die <i>emm</i> Typisierung.....	7
2.2.1.2 Das M Protein - Hauptvirulenzfaktor von <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	8
2.2.2 Chromosomalkodierte Virulenzfaktoren .....	10
2.2.3 Bakteriophagenkodierte Virulenzfaktoren.....	10
2.2.3.1 Superantigene.....	10
2.2.3.2 Weitere phagenassoziierte Faktoren .....	11
<b>2.3 Rheumatisches Fieber.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Kollagen IV Bindung.....	12
<b>2.4 Mobile genetische Elemente .....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Bakteriophagen.....	13
2.4.2 Natürlich vorkommende Plasmide.....	16
<b>2.5 Genotypisierung von Streptokokken mit einem individuell gefertigten</b>	
<b>DNA-Microarray .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 M Protein-Gen (<i>emm</i>) Typisierung von <i>S. pyogenes</i> .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 <i>emm</i> -Typ Distribution von Gruppe A Streptokokken in Indien.....	24
3.1.2 Isolationsquelle der Gruppe A Streptokokken.....	25
<b>3.2 Kollagen IV Bindung .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Untersuchung der Kollagen IV-Bindung indischer Isolate.....	27
3.2.2 Charakterisierung der Kollagen IV-Bindung.....	29
3.2.3 Charakterisierung der Kollagen IV-Bindung von Streptokokken des Serotyps M74.....	30
<b>3.3 Molekularepidemiologische Analyse der Streptokokkenisolate mittels Microarray .....</b>	<b>33</b>
3.3.1 Allgemeine Distribution der Gene.....	33
3.3.2 Clusterdendrogramm .....	34
3.3.3 Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren.....	35
3.3.4 Serotypabhängige Distribution von charakterisierten Virulenzfaktoren.....	38
3.3.5 Vergleich der Gendistribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten .....	39
<b>3.4 Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokken .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Allgemeine Distribution von Superantigenen.....	42
3.4.2 Superantigenprofile von Gruppe A Streptokokken.....	44
3.4.3 Vergleich der Diversität der Superantigenprofile in Abhängigkeit vom Serotyp .....	45
3.4.4 Co-Detektion von Superantigenen.....	47
3.4.5 Prophagen in Gruppe A Streptokokken .....	50

<b>3.5 Natürlich vorkommende Plasmide in Gruppe A Streptokokken .....</b>	<b>52</b>
3.5.1 Serotypspezifisches Vorkommen von Plasmiden .....	53
3.5.2 PCR basierte Detektion von Genen für Replikations-initiationsproteine .....	54
3.5.3 Epidemiologie natürlich vorkommender Plasmide in Gruppe A Streptokokken .....	55
3.5.4 Sequenzierung der bisher unbekannten Plasmide .....	57
3.5.4.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid pA996 .....	57
3.5.4.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid pA852 .....	60
3.5.5 Funktionelle Charakterisierung von ORF5 des Plasmids pA996 .....	62
3.5.5.1 Wachstumsinhibitions-Assay mit dem Isolat A996 als Teststamm .....	62
3.5.5.2 Klonierung des ORF5 .....	65
3.5.6 Plasmide in Gruppe C und G Streptokokken .....	67
 <b>4 Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Vergleich der <i>emm</i>-Typ Distribution von Gruppe A Streptokokken aus industrialisierten Ländern und Indien.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2 Kollagen IV Bindung .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3 Microarrayanalyse .....</b>	<b>72</b>
4.3.1 Vergleich der Gendistribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten .....	72
4.3.2 Vergleichende Distributionsanalyse zwischen indischen und niederländischen Isolaten anhand ausgewählter Gene .....	76
<b>4.4 Distribution von bakteriophagenkodierten Virulenzfaktoren.....</b>	<b>78</b>
4.4.1 Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokkenisolaten und Isolaten der Industrieländer .....	78
4.4.2 Vergleich von phagenassoziierten Virulenzfaktoren der Serotypen M3, M12 und M28 aus Indien und den Niederlanden .....	79
4.4.3 Vergleich der Superantigenprofile indischer und norwegischer Gruppe A Streptokokken .....	81
4.4.4 Co-Detektion von Superantigenen.....	82
<b>4.5 Prophagen in Gruppe A Streptokokken .....</b>	<b>82</b>
<b>4.6 Natürlich vorkommende Plasmide bei Streptokokken.....</b>	<b>84</b>
 <b>5 Material und Methoden.....</b>	<b>87</b>
<b>5.1 Material und Chemikalien .....</b>	<b>87</b>
5.1.1 Bakterienstämme .....	87
5.1.2 Kulturmedien .....	88
5.1.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen der Streptokokken.....	88
5.1.2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>E. coli</i> -Stämme.....	88
5.1.3 Stammhaltung von Bakterien .....	88
5.1.4 Plasmide .....	89
5.1.5 Oligonukleotide für die PCR und für Sequenzierungen .....	89
5.1.6 Reagenzien .....	91
5.1.6.1 Restriktionsendonukleasen .....	91
5.1.6.2 Antibiotika .....	91
5.1.6.3 Enzyme für Versuche mit Proteinen .....	91
5.1.6.4 Molekularbiologische Kits.....	91

<b>5.2 Methoden für die Microarrayanalyse .....</b>	<b>92</b>
5.2.1 Präparation genomischer DNA aus <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	92
5.2.2 Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNA .....	92
5.2.3 Konzentrationsbestimmung fragmentierter DNA.....	93
5.2.4 Biotinylierung fragmentierter DNA.....	94
5.2.5 Erstellung des Hybridisierungsgemisches .....	94
5.2.6 Hybridisierung .....	94
5.2.7 Färbung und Signaldetektion .....	95
5.2.8 Auslesen der Fluoreszenzintensitäten .....	95
5.2.9 Datenprozessierung der ausgelesenen Fluoreszenzintensitäten .....	95
<b>5.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>97</b>
5.3.1 Polymerasekettenreaktion.....	97
5.3.1.1 Standard-PCR .....	97
5.3.1.2 Colony-PCR.....	98
5.3.2 Agarosegelelektrophorese.....	98
5.3.3 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel .....	99
5.3.4 Aufreinigung der PCR-Amplifikate.....	99
5.3.5 Plasmidisolierung .....	99
5.3.6 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren .....	99
5.3.7 Ligation von Nukleinsäuren .....	100
<b>5.4 Biochemische Methoden .....</b>	<b>101</b>
5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli) .....	101
5.4.2. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	101
5.4.3 Proteindialyse .....	101
5.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976).....	102
<b>5.5 Expression von rekombinanten Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>103</b>
5.5.1 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> unter Verwendung von TSS-Puffer und Transformation .....	103
5.5.2 Überexpression rekombinanter Fusionsproteine in <i>E. coli</i> .....	104
5.5.3 Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie .....	104
5.5.4 Induktion der Überexpression des durch ORF5 kodierten reifen Proteins des Plasmid pA996.....	105
<b>5.6 Methoden für Versuche mit <sup>125</sup>I markierten Proteinen .....</b>	<b>105</b>
5.6.1 Markierung von Proteinen mit <sup>125</sup> Iod.....	105
5.6.2 Bindungsversuche mit <sup>125</sup> I-Collagen IV .....	105
5.6.3 Dot-Blot-Analyse.....	106
<b>5.7 Puffer und Lösungen, soweit nicht in Methoden beschrieben .....</b>	<b>107</b>
 <b>6 Anhang.....</b>	 <b>109</b>
6.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid pA852.....	109
6.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid pA996.....	111
6.3 Anhang Tabellen .....	114
6.4 Stammsammlungsliste .....	116
6.5 Literatur.....	120
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>134</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 2.1:</b> Systematik .....	5
<b>Abbildung 2.2:</b> Zahlreiche Virulenzfaktoren von Gruppe A Streptokokken sind an der Wirt-Pathogen- interaktion beteiligt.....	7
<b>Abbildung 2.3:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme von Phagenpartikeln aus dem Kulturüberstand des Streptokokkenisolats MGAS315.....	13
<b>Abbildung 2.4:</b> Schematische Abbildung des r1t-like Bakteriophagen $\Phi$ 370.3 des Streptokokken- isolates MGAS370.....	14
<b>Abbildung 2.5:</b> Hypothetisches Model für den Austausch von Toxingenen zwischen Bakteriophagen.....	15
<b>Abbildung 2.6:</b> Schematische Darstellung des Wachstumsinhibitionsversuchs. ....	17
<b>Abbildung 2.7:</b> Schematische Abbildung des GAS Kerngenoms, Integrationsstellen von Prophagen im Wirtschromosom und phagenkodierte Virulenzfaktoren.....	20
<b>Abbildung 3.1:</b> Distribution der Serotypen von Gruppe A Streptokokken in Indien.....	24
<b>Abbildung 3.2:</b> <sup>125</sup> I-KollagenIV-Bindung der nordindischen Isolate.....	27
<b>Abbildung 3.3:</b> <sup>125</sup> I-Kollagen IV-Bindung der südindischen Isolate. ....	28
<b>Abbildung 3.4:</b> <sup>125</sup> I-Kollagen IV-Bindung vor und nach Verdau der bakteriellen Kapsel mit Hyaluronidase. ...	29
<b>Abbildung 3.5:</b> Alignment der PARF Region der Serotypen <i>emm3.22</i> und <i>emm3.23</i> .....	30
<b>Abbildung 3.6:</b> Mikroskopische Aufnahmen der Kollagen IV-Bindung von verschiedenen Streptokokkenisolaten. ....	31
<b>Abbildung 3.7:</b> <sup>125</sup> I-Kollagen IV-Bindung vor und nach Hitzedenaturierung. ....	32
<b>Abbildung 3.8:</b> Clusterdendrogramm von 201 Streptokokkenisolaten auf Grundlage des Genrepertoires. ....	34
<b>Abbildung 3.9:</b> Serotypabhängige Distribution ausgewählter Virulenzfaktoren. ....	38
<b>Abbildung 3.10:</b> Distribution der Superantigene bei indischen Gruppe A Streptokokken. ....	43
<b>Abbildung 3.11:</b> Präsenz von prophagenassoziierten Genen in Gruppe A Streptokokken. ....	51
<b>Abbildung 3.12:</b> Agarosegel der DNA Präparation von Gruppe A Streptokokken. ....	53
<b>Abbildung 3.13:</b> Dendrogramm der Gene für Replikationsinitiationsproteine der Spezies <i>Streptococcus</i> und <i>Staphylococcus</i> . ....	55
<b>Abbildung 3.14:</b> Distribution natürlich vorkommender Plasmide bei indischen Gruppe A Streptokokken. ....	56
<b>Abbildung 3.15:</b> Vektorkarte des Gruppe A Streptokokken Plasmids pA996.....	58
<b>Abbildung 3.16:</b> Aminosäuresequenz des durch ORF5 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.....	59
<b>Abbildung 3.17:</b> Aminosäuresequenz des durch ORF6 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.....	59
<b>Abbildung 3.18:</b> Vektorkarte des Gruppe A Streptokokken Plasmids pA852.....	60
<b>Abbildung 3.19:</b> Aminosäuresequenz des durch ORF3 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.....	61
<b>Abbildung 3.20:</b> Wachstumsinhibitions-Assay.....	62
<b>Abbildung 3.21:</b> Wachstumsinhibitions-Assay mit dem Isolat A996 als Teststamm. ....	63
<b>Abbildung 3.22:</b> Wachstumskurve und Ergebnisse der Plattierung.....	65
<b>Abbildung 3.23:</b> Agarosegelelektrophorese der Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> pREP4 pQE30_ORF5.....	66
<b>Abbildung 3.24:</b> Amplifikate der Plasmide von Gruppe C und G Streptokokken. ....	67
<b>Abbildung 4.1:</b> Vergleich der am häufigsten auftretenden Serotypen von Gruppe A Streptokokken in Indien und in den Industrieländer. ....	70
<b>Abbildung 4.2:</b> Alignment der 5' Nukleotidsequenzen der Gene <i>spa18</i> und <i>spa36</i> . ....	74
<b>Abbildung 4.3:</b> Vergleich von selektierten phagenassoziierten Virulenzfaktoren der Serotypen M3, M12 und M28 aus Indien und den Niederlanden.....	80
<b>Abbildung 4.4:</b> Schematische Darstellung der Integration eines Bakteriophagen in das Wirtschromosom von <i>Streptococcus pyogenes</i> SF370. ....	83

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 2.1:</b> M Proteine und ihre Liganden.....	9
<b>Tabelle 2.2:</b> Übersicht der bisher beschriebenen Plasmide bei Gruppe A Streptokokken .....	16
<b>Tabelle 3.1:</b> Isolationsquelle der Gruppe A Streptokokken.....	26
<b>Tabelle 3.2:</b> Isolationsquelle der für den Microarray verwendeten Streptokokkenisolate. ....	33
<b>Tabelle 3.3:</b> Allgemeine Präsenz der Gene in Gruppe A Streptokokken. ....	33
<b>Tabelle 3.4:</b> Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken in Indien .....	36
<b>Tabelle 3.5:</b> Vergleich der allgemeine Präsenz der Gene in Gruppe A Streptokokken zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolat.....	39
<b>Tabelle 3.6:</b> Vergleich der Distribution von ausgewählten Genen zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolat.....	41
<b>Tabelle 3.7:</b> Superantigenprofile der indischen Gruppe A Streptokokken.....	44
<b>Tabelle 3.8:</b> Anordnungsbeziehung zwischen <i>emm</i> -Typ und Superantigenprofil.....	46
<b>Tabelle 3.9:</b> Co-Detektionsraten von Superantigenen bei Gruppe A Streptokokken .....	47
<b>Tabelle 3.10:</b> Übersicht der Co-Detektion der Superantigene in Abhängigkeit von der Isolationsquelle. ....	48
<b>Tabelle 3.11:</b> Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide der Gruppe A Streptokokken. ....	54
<b>Tabelle 3.12:</b> Übersicht der Wachstumsinhibition von verschiedenen Indikatorstämmen, verursacht durch das <i>S. pyogenes</i> Isolat A996.....	64
<b>Tabelle 4.1:</b> Vergleichende Distributionsanalyse zwischen indischen und niederländischen Isolat anhand ausgewählter Gene .....	77
<b>Tabelle 4.2:</b> Vergleich der Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokken- isolaten und Isolat der Industrieländer.....	79
<b>Tabelle 4.3:</b> Vergleich der häufigsten Superantigenprofile indischer und norwegischer Streptokokken.....	81
<b>Tabelle 5.1:</b> In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	89
<b>Tabelle 5.2:</b> Oligonukleotide.....	89
<b>Tabelle 5.3:</b> Restriktionsenzyme mit entsprechender Erkennungssequenz. ....	91
<b>Tabelle 5.4:</b> Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion .....	94
<b>Tabelle 5.5:</b> Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches .....	94
<b>Tabelle 5.6:</b> Polyacrylamidgele.....	108
<b>Tabelle 6.1:</b> Vollständige Liste der Genprofile .....	114
<b>Tabelle 6.2:</b> Serotypabhängige Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren.....	115
<b>Tabelle 6.3:</b> Stammsammlungsliste der verwendeten Gruppe A Streptokokken .....	116

# 1 Zusammenfassung

*Streptococcus pyogenes* ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger, der sowohl lokale Infektionen der Haut und des Rachens als auch schwerwiegende invasive Erkrankungen hervorruft. Als Folge von Streptokokkeninfektionen können des Weiteren Autoimmunerkrankungen wie rheumatisches Fieber, rheumatische Endokarditis und akute Glomerulonephritis auftreten. Im Gegensatz zur intensiven Erforschung der von Gruppe A Streptokokken verursachten Erkrankungen in den industrialisierten Ländern sind die Untersuchungen in Indien auf nur wenige Forschungszentren beschränkt. Darüberhinaus liegen für Indien nur sehr wenige Daten über die Verteilung der *emm*-Typen vor. Umfassende molekularepidemiologische Untersuchungen und Vergleiche der Virulenzfaktoren fehlen ebenso, obwohl Streptokokkeninfektionen ein ernsthaftes gesundheitliches Problem in Indien darstellen.

In dieser Arbeit wurde daher die *emm*-Typ Distribution von 279 Gruppe A Streptokokkenisolaten aus zwei indischen Regionen untersucht. Die indischen Isolate zeigten mit 91 verschiedenen *emm*-Typen eine sehr hohe Heterogenität. Es wurde allerdings gezeigt, dass zahlreiche der am häufigsten auftretenden Serotypen der Industrieländer nicht bzw. nur mit wenigen Isolaten in Indien vertreten sind. Im Gegensatz dazu wurden in Indien zahlreiche Serotypen häufig isoliert, die in den industrialisierten Ländern nicht unter den 25 häufigsten Typen zu finden waren. Diese Unterschiede in der Distribution der *emm*-Typen in Indien und den Industrieländern haben Konsequenzen hinsichtlich der Entwicklung eines M Protein-basierten Impfstoffs.

Die Resultate der Microarrayanalyse von 201 Streptokokkenisolaten zeigten eine serotypspezifische Distribution der untersuchten putativen und beschriebenen Virulenzfaktoren, wobei die größten Unterschiede bei den bakteriophagenassoziierten Genen zu verzeichnen waren. Beim Vergleich des Genrepertoires invasiver Isolate mit nicht-invasiven Isolaten wurden sechs Gene identifiziert, welche signifikant häufiger bei invasiven Isolaten auftraten.

Bei näherer Betrachtung der Superantigene wurden 63 distinkte Superantigenprofile identifiziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in Indien isolierten Streptokokken weniger Superantigene pro Isolat aufwiesen, verglichen mit Stämmen, die in den Industrieländern isoliert wurden. Trotz der geringeren Präsenz einzelner Superantigene wurde eine größere Variabilität in der Kombination dieser Faktoren verzeichnet. Die in Indien vorherrschenden Genprofile unterschieden sich stark von denen der industrialisierten Länder.

Durch Streptokokken hervorgerufene rheumatische Erkrankungen stellen insbesondere in Indien ein ernsthaftes gesundheitliches Problem dar. Als einer der



Schlüsselmechanismen bei der Entstehung von akutem rheumatischem Fieber wird die Bindung von Kollagen IV auf der Bakterienoberfläche betrachtet. Diese wurde bisher nur bei stark bekapselten Serotypen, wie z.B. Serotyp M18 bzw. bei Isolaten des Serotyps M3 beobachtet. Verantwortlich für diese Bindung sind die Hyaluronsäurekapsel bzw. das M3 Protein. In dieser Arbeit wurde hingegen erstmalig eine nicht-kapselvermittelte, nicht M Protein abhängige Kollagen IV-Bindung des Serotyps M74 gezeigt. Diese Bindung wird durch ein bisher unbekanntes, hitzestabiles Protein vermittelt. Es wurde eine einzigartige Bindungseigenschaft im Vergleich zu M3 und M18 Isolaten festgestellt, welche nach Hitzedenaturierung keine Kollagen IV-Bindung zeigten.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Verteilung von Plasmiden innerhalb der indischen Isolate untersucht. Plasmide können, neben anderen mobilen genetischen Elementen, die Fitness bzw. die Überlebensfähigkeit einzelner Stämme durch Faktoren wie Bakteriocine oder Antibiotika-Resistenzgene erheblich verbessern. Mit Hilfe der PCR-basierten Detektion der Gene für Replikationsproteine wurde erstmalig eine Distributionsanalyse natürlich vorkommender Plasmide bei Gruppe A Streptokokken durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 13 Serotypen identifiziert, welche ein Plasmid tragen können, d.h., nicht alle Isolate eines Serotyps müssen ein Plasmid tragen. Dies entspricht 16,9% der 77 in Indien isolierten Serotypen. Dabei wurde unter anderem eine subtypspezifische Präsenz der Plasmide gezeigt. Durch den Vergleich der Co-Detektionen der Gene *repA/SA-M57* bzw. *repB/dysA* wurden zwei bisher unbeschriebene Plasmide identifiziert und vollständig sequenziert.

Das neu beschriebene Plasmid pA996 gehört zu der pC194/pUB110 Familie der *rolling-circle* Plasmide, welche die zahlenmäßig größte Gruppe von Plasmiden mit einer sehr hohen Diversität repräsentieren. Die drei charakteristischen Elemente von Plasmiden, welche nach dem *rolling-circle* Mechanismus replizieren, wurden beim Plasmid pA996 nachgewiesen: (i) ein Gen welches das Replikationsinitiationsprotein kodiert, (ii) den *double-strand* (DSO) und (iii) *single-strand* (SSO) Replikationsursprung. Das zweite erstmalig charakterisierte Plasmid pA852 zeigt signifikante Homologien zu Plasmiden der pMV158 Familie. Neben den charakteristischen Komponenten wie DSO und SSO, konnte hier noch das Gen für das Replikationsinitiationsprotein *repB* und das Gen für das Repressorprotein *copG* nachgewiesen werden. Außer diesen Elementen, die für die Replikation der Plasmide eine wichtige Rolle spielen, wurden auf beiden Plasmiden weitere offene Leseraster identifiziert, die potentielle Bakteriocine kodieren. Wachstumsinhibitionsstudien zeigten weiterhin, dass plasmidtragende Isolate in der Lage waren, das Wachstum anderer Spezies zu hemmen, was zusätzlich darauf hindeutet, dass es sich um bakteriocintragende Plasmide handelt.

## Summary

*Streptococcus pyogenes* (Group A streptococcus; GAS) is a human-specific bacterial pathogen, causing a wide range of diseases varying in symptoms and severity. These include pharyngitis and skin diseases such as scarlet fever, impetigo and pyoderma, as well as invasive diseases such as streptococcal toxic shock syndrome and necrotising fasciitis. Post-infectious diseases are rheumatic fever, rheumatic heart disease and post-streptococcal glomerulonephritis. Although acute rheumatic fever has become rare in highly industrialized countries, it remains the leading cause of heart disease among children and young adults in many developing and newly industrializing countries like India. Streptococcal research has attracted the attention of the international scientific community for many decades. In industrialized countries, like the USA and Europe, surveys of the diseases have been carried out to determine the incidence of GAS pharyngitis, streptococcal invasive diseases as well as rheumatic fever. In contrast, the research on streptococcal diseases in India has been restricted to a couple of centres and has focused mainly on the epidemiology of acute rheumatic fever. Streptococcal pharyngitis but also the invasive diseases have totally been neglected. There are only a few publications concerning the *emm* type distribution. The *emm* gene, which encodes the major virulence factor M protein, allows the classification into different serotypes. The importance of *emm* typing can be found in studies demonstrating associations between certain M types and disease. Comprehensive epidemiological examinations as well as the comparison of virulence factors are missing, although the burden of streptococcal infections in India is extremely high.

To obtain insights into the distribution of the serotypes in India 279 GAS isolates from two different geographical regions were *emm* typed. They showed a great heterogeneity with 91 different *emm* types. However, it could be shown that numerous of the most common serotypes in industrialized countries are lacking or are only present with a few isolates in India. In contrast, numerous serotypes could be isolated in India that were not present among the 25 most common serotypes in industrialized countries. These results suggest the current formulation of the 26-valent M protein vaccine would provide limited coverage of disease causing GAS *emm* types in India.

The results of the 201 GAS isolates analysed by DNA microarray showed a serotype specific distribution of genes encoding virulence factors and putative extracellular proteins. The genetic variation is primarily mediated by bacteriophages. By comparison of the gene repertoire of invasive with non-invasive isolates six genes could be identified that showed a significant higher occurrence in invasive isolates.

A detailed examination of the streptococcal superantigens identified 63 distinct superantigen profiles. Each of these profiles showed a unique combination of the

superantigen genes. Furthermore, the Indian isolates possessed fewer superantigens per isolates than GAS isolates from industrialized countries. Although a lower frequency of superantigens was detected a greater variability of combinations appeared.

Post-infectious rheumatic diseases remain a serious health problem in India. Direct binding of collagen type IV to streptococcal surface components is considered as one of the key mechanisms for induction of acute rheumatic fever. This interaction is only published for mucoid, encapsulated serotypes, like M18 isolates, or isolates of the serotype M3. Previous studies identified the hyaluronic acid capsule and the M3 protein as streptococcal surface components that directly interact with collagen IV. For the first time, we demonstrated a capsule independent, non M protein mediated collagen IV binding of serotype M74. In contrast to serotype M3 and M18 isolates which lost their ability to bind collagen IV after heat denaturation, the collagen IV binding capacity of M74 remained unchanged. These results indicate that collagen binding by M74 isolates is mediated by an unknown, heat stable protein.

In the third part of the work the distribution of naturally occurring plasmids in Indian group A streptococcal isolates was determined. Besides other mobile genetic elements, plasmids may contribute to the fitness and survival by factors like antibiotic resistance genes or bacteriocins. Bacteriocins are proteinaceous toxins produced by bacteria that inhibit the growth of similar or closely related bacterial strains. Thirteen different plasmid harboring serotypes (16.9% of the 77 isolated serotypes) were identified by screening PCRs, showing a serotype specific distribution. By comparing the co-detection of the genes *repA*/SA-M57 and *repB*/*dysA* two unpublished plasmid were identified und completely sequenced.

The identified plasmid pA996 harbored by a serotype M44 isolate belongs to the pC194/pUB110 family of rolling circle plasmids. The three characteristic elements of rolling circle plasmids were detected: (i) the *rep* gene, encoding the replication initiation protein, (ii) the double strand origin of replication (DSO), and (iii) the single strand origin of replication (SSO). The second newly characterised plasmid pA852 displaying serotype M11 showed significant homologies to plasmids of the pMV158 family. Besides the characteristic elements DSO, SSO and *repB* (replication initiation protein B) the gene *copG*, encoding a repressor protein, were detected. Aside from these elements, involved in the replication process of the plasmids, further open reading frames were identified. Computer based analysis predicted potential bacteriocins. Additionally, growth inhibition experiments showed the potential of the plasmid harboring isolate A996 to inhibit other bacterial strains, indicating the production of a bacteriocinogen peptide.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Streptococcus pyogenes* – Gruppe A Streptokokken

Streptokokken sind grampositive Kokken, die üblicherweise in langen Ketten wachsen. Mehrere Streptokokkenarten sind wirkungsvolle menschliche Pathogene. Eine dieser Arten ist der ausschließlich humanpathogene Erreger *Streptococcus pyogenes*. Dieser gehört zur Gruppe der homofermentativen Bakterien, der seine Energie durch Fermentation von Glukose zu Laktat bezieht. Des Weiteren sind Streptokokken aerotolerant und katalasenegativ. *Streptococcus pyogenes* kann sich nicht aktiv bewegen und bildet keine Sporen. Die systematische Einordnung ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die Fähigkeit zur Hämolyse. Die Art der hämolytischen Reaktion auf Blutagarplatten wurde lange Zeit zur Klassifizierung von Streptokokken verwendet. Man unterscheidet dabei drei Arten: alpha-, beta- und gamma-Hämolyse.

Abteilung:	<i>Firmicutes</i>
Klasse:	<i>Bacilli</i>
Ordnung:	<i>Lactobacillales</i>
Familie:	<i>Streptococcaceae</i>
Gattung:	<i>Streptococcus</i>
Art:	<i>Streptococcus pyogenes</i>

**Abbildung 2.1: Systematik**

Alpha-Hämolyse ist durch eine partielle bzw. „grüne“ Hämolyse charakterisiert, hervorgerufen durch die Reduktion von Hämoglobin. Beta-Hämolyse wird durch die vollständigen Lyse von Erythrozyten definiert. Dies äußert sich in der Bildung klarer Höfe um wachsende Kolonien auf Blutagarplatten und wird durch die Produktion von Streptolysin O bei *Streptococcus pyogenes* hervorgerufen. Nichthämolytische Kolonien werden als gamma-hämolytisch bezeichnet. Während Gruppe A Streptokokken ausschließlich durch beta-Hämolyse charakterisiert sind, kann bei Gruppe B Streptokokken alpha-, beta- oder gamma-Hämolyse beobachtet werden. *Streptococcus pneumoniae* ist alpha-hämolytisch, kann aber während anaerober Inkubation eine beta-Hämolyse zeigen. Die Eigenschaft der Hämolyse ist deshalb kein eindeutiges Kriterium zur Identifikation von Streptokokken, wird aber dennoch zur schnellen Unterscheidung von *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* verwendet.

Streptokokken und verwandte Kokken werden weiterhin in immunologische Gruppen eingeteilt. Grundlage hierfür ist das Vorhandensein spezifischer Kohlenhydratantigene bzw. des C-Polysaccharids. Diese Antigengruppen (auch Lancefield-Gruppen genannt) werden mit den Buchstaben A-H und K-V bezeichnet. Die Lancefield-Gruppe A, zu der

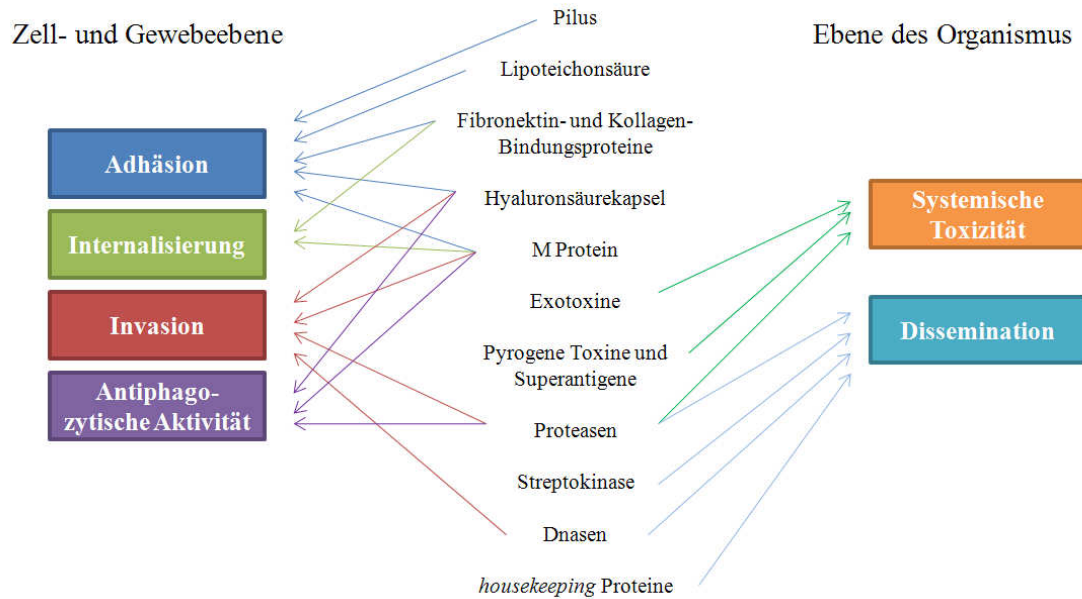
*Streptococcus pyogenes* als einziger Vertreter zählt, ist eine der 20 spezifischen Antigengruppen.

*Streptococcus pyogenes* wird neben *Streptococcus pneumoniae* oft aus den oberen Atemwegen gesunder Erwachsener isoliert. Unter bestimmten Umständen, wie z. B. eine geschwächte Immunabwehr des Wirtes bzw. das Auftreten neuer, hochvirulenter Isolate, kann es zu akuten Streptokokkeninfektionen kommen. *Streptococcus pyogenes* ist die Ursache von Streptokokkenpharyngitis (Angina tonsillaris). Des Weiteren können Infektionen des Innenohres (Otitis media) und der oberen Hautschichten (Impetigo und Hautläsionen), sowie Scharlach auftreten. Neben diesen lokalen Infekten der Haut und der Schleimhäute können schwerwiegende, invasive und lebensbedrohliche Krankheitsverläufe wie Sepsis (*streptococcal toxic shock syndrome*, STSS) und nekrotisierende Fasciitis vorkommen. Als Folge von Streptokokkeninfektionen können Autoimmunerkrankungen wie rheumatisches Fieber, rheumatische Endokarditis und akute Glomerulonephritis auftreten. Diese Folgeerkrankungen stellen insbesondere in Entwicklungsländern ein großes Problem dar.

## 2.2 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pyogenes*

Wie beschrieben wurde, verursachen Gruppe A Streptokokken ein breites Spektrum an Erkrankungen. Daher muss sich das Pathogen an verschiedene physiologische Bedingungen im Wirt anpassen. Der erste Schritt der Kolonisierung besteht in der Anheftung an das Wirtsgewebe, der durch bakterielle Adhäsine vermittelt wird. Diese ermöglichen eine Bindung an das Epithelium der Schleimhäute und der Haut. Des Weiteren gehören die Überwindung der physikalischen Abwehr und das Entkommen der ersten Immunabwehr im Speichel zur erfolgreichen Kolonisierung des Oropharynx. Einige der Adhäsine, wie z.B. das M1 Protein (Cue, 1998) und Sfb1 (*streptococcal fibronectin binding protein 1*) (Molinari, 2007; Jadoun, 1998), stellen potente Invasine dar, die es *S. pyogenes* ermöglichen, die eigene Aufnahme in die eukaryotische Wirtszellen auszulösen.

Durch die Verbreitung vom initialen Infektionsherd aus entstehen invasive Krankheitsbilder. Bei diesem Prozess überwindet das Bakterium die lokale Infektionsstelle und breitet sich im Blut aus. Um dort zu überleben, bzw. persistieren zu können wurden zahlreiche Strategien und komplexe regulatorische Mechanismen entwickelt. Zahlreiche bekannte und putative Virulenzfaktoren sind an der Wirt-Pathogeninteraktion beteiligt (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Zahlreiche Virulenzfaktoren von Gruppe A Streptokokken sind an der Wirt-Pathogeninteraktion beteiligt.** Diese ermöglichen die Adhäsion, Internalisierung und Invasion des Wirts. Eine weitere Interaktion auf der Zell- und Gewebeebene stellt die antiphagozytische Aktivität dar. Auf der Ebene des Organismus ermöglichen zahlreiche Faktoren die Dissemination und können toxischen Schock verursachen. Die Gruppen der Virulenzfaktoren können während unterschiedlicher Phasen der Infektion interagieren.

### 2.2.1 Das M Protein

#### 2.2.1.1 Einführung in die *emm* Typisierung

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von Gruppe A Streptokokken ist das M Protein. Dieses Oberflächenprotein wurde von R. Lancefield zur Unterscheidung von verschiedenen M Protein Serotypen in einem eigens entwickelten Serotypisierungssystem verwendet (Lancefield, 1928). Bei dieser Methode wurden durch Hitze und 0,1 N HCl das Gruppe A Karbohydrat, das M Protein und die Zellwand extrahiert. Der geklärte Extrakt diente zur Bestimmung des M Proteins mit Hilfe standardisierter Typisierungsseren. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region des M Proteins von diesen spezifischen Typisierungsseren erkannt wurde (Beachey, 1981; Fischetti, 1989; Jones, 1988; Lancefield 1962). Zahlreiche Schwierigkeiten bei der M Protein Serotypisierung, wie mehrdeutige Ergebnisse, die Entdeckung neuer Serotypen und die limitierte Verfügbarkeit von Antiseren, führten zur Entwicklung eines nukleotidsequenzbasierten Systems auf Grundlage des *emm* Gens. In den späten 1990er Jahren wurde die klassische serologische M Protein Typisierung weitestgehend durch das *sequence typing* abgelöst (Facklam, 1999).

Dieses nukleotidsequenzbasierte System beruht auf der Verwendung von Primern in hoch-konservierten Sequenzenabschnitten des *emm* Gens um dieses zu amplifizieren. Das *emm* Gen, definiert als das Genamplifikat von *S. pyogenes* mit den Primern *allemm\_fwd* und *allemm\_rev*, kodiert das M Protein, von dem es ca. 100 verschiedene Serotypen gibt. Die Nukleotidsequenz des hypervariablen Bereichs der M Proteine liegt in unmittelbarer Nähe des *forward* Primers und kann daher direkt sequenziert werden.

In der *Center for Disease Control and Prevention* Datenbank (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.htm>) werden die Nukleotidsequenzen, welche die ersten 50 Aminosäuren des reifen M Proteins kodieren, aufgeführt. Unterschiede von wenigen Nukleotiden bzw. Kodons im *emm* 5' Terminus können einen anderen *emm* Typ zur Folge haben. Zum Beispiel besitzt *emm68.1* eine Deletion von 21 Nukleotiden innerhalb der ersten 150 Nukleotide des reifen M Proteins. Obwohl das M68.1 Protein spezifisch mit dem M68-Antiserum (kreuz)reagiert ist es nicht identisch zum M68 Referenzprotein. Häufig vorkommende *emm*-Typen werden auf Grundlage dieser 150 Nukleotide in Untergruppen eingeteilt. Die Mehrzahl der Typ *emm3* Isolate in den USA besitzen den Subtyp *emm3.1* (ca. 75–80%), wohingegen der Subtyp *emm3.4* nur ca. 20% der *emm3* Isolate ausmacht.

Jede Variation innerhalb der ersten 150 Basen, welche die 50 Aminosäuren des reifen M Proteins kodieren, resultiert in der Benennung eines neuen Subtyps (z. B.: *emm3.1*, *emm3.2*, *emm6.1*, *emm6.2*, usw.). Der Referenzstamm ist immer mit .0 gekennzeichnet.

### 2.2.1.2 Das M Protein - Hauptvirulenzfaktor von *Streptococcus pyogenes*

Der Beitrag des M Proteins zur Virulenz von *Streptococcus pyogenes* reicht von Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen (Caparon, 1991; Cue, 1998), zur Penetration des Gewebes (Berge, 1993) und die antiphagozytische Aktivität gegen die angeborene und adaptive Immunantwort (Heath, 1989; Horstmann, 1988). Der antiphagozytische Effekt des M Proteins lässt sich durch zwei Mechanismen erklären. Eine Strategie besteht darin, dass Komplementregulationsproteine des Wirts, wie Faktor H und Faktor H-like Protein (Horstmann, 1988), an das M Protein gebunden werden. Eine weitere Komponente des Komplementregulationssystems, das C4b-Bindungsprotein, bindet ebenso an den Hauptvirulenzfaktor und inhibiert somit die Phagozytose (Berggard, 2001). Ein zweiter antiphagozytotischer Mechanismus besteht in der Bindung von Fibrinogen. Diese Bindung, wie auch die Bindung an Faktor H, mindert drastisch die komplementvermittelte Bindung von C3b an die bakterielle Zelloberfläche und verhindert somit die Erkennung durch polymorphkernige Leukozyten (Whitnack, 1985).

Das M Protein vermittelt weiterhin die Bindung zahlreicher Wirtsproteine. Die Bindung dieser Liganden wurde in Abhängigkeit vom M Protein in Tabelle 2.1 dargestellt.

Die Bindung von Plasminogen an zahlreiche M Proteine ist eine Voraussetzung für deren Virulenz. Eine Wirtsantwort auf bakterielle Infektionen ist die Bildung einer

lokalen Thrombose und mikrovaskuläre Okklusionen. Dies soll vor der systemischen Ausbreitung von *Streptococcus pyogenes* schützen.

**Tabelle 2.1: M Proteine und ihre Liganden:** Darstellung nach Smeesters, 2010

M Protein	Ligand	M Protein	Ligand
M1	Fibronectin	M12	IgG3
	Kininogen		Albumin
	Fibrinogen	M22	C4BP
	IgG3		IgA
M2	Albumin		IgG1,2,3,4
	C4BP		CD46 (auf Lymphozyten)
	IgG1,2,3,4	M24	Fibrinogen
M3	Fibronectin	M28	IgA
	Fibrinogen		IgG1,2,3,4
	Albumin	M33	Plasminogen
	Kollagen IV	M41	Plasminogen
M4	C4BP	M46	Kininogen
	IgA	M49	Albumin
	IgG3		IgG
M5	Faktor H-like Protein 1	M50	IgG
	Fibrinogen	M52	Plasminogen
	Faktor H	M53	Plasminogen
	Albumin	M55	Albumin
	CD46 (auf Lymphozyten)		Fibrinogen
M6	Kininogen		IgG1,2,3,4
	Faktor H-like Protein 1	M56	Plasminogen
	Fibronectin	M60	C4BP
	Fibrinogen		IgA
	CD46 (auf Lymphozyten)		IgG3
	Faktor H		

Die Aktivierung von Plasminogen zur Serinprotease Plasmin auf der bakteriellen Oberfläche führt jedoch zur Degradation von Fibrinogen am lokalen Infektionsherd und ermöglicht dem Bakterium somit die Dissemination in tiefere Gewebeschichten (Sun, 2004).

Die Bindung von Immunglobulinen konnte für zahlreiche M Proteine gezeigt werden. Die Interaktion mit diesen soll zur Resistenz gegenüber Phagozytose beitragen. Man unterscheidet die Bindung von IgA und IgG3. Nur wenige M Proteine können die vier Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 binden. Dies indiziert unabhängige Bindungsstellen für IgG Subtypen im M Protein.



### 2.2.2 Chromosomalkodierte Virulenzfaktoren

Die meisten für *Streptococcus pyogenes* beschriebenen Virulenzfaktoren sind chromosomalkodiert. Neben dem bereits beschriebenen Hauptvirulenzfaktor M Protein zählen die zahlreichen Adhäsine, wie z. B. die Fibronectinbindungsproteine und das kollagenbindende Protein Cpa, dazu. Einige Adhäsine stellen auch potente Invasine dar, die es *Streptococcus pyogenes* ermöglichen, die Aufnahme in Wirtszellen zu ermöglichen. Neben den für die Adhärenz wichtigen Faktoren besitzen Gruppe A Streptokokken eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren, die für die erfolgreiche Ausbreitung und die Umgehung der Immunabwehr des Wirtes essentiell sind. Genannt werden sollen hier nur einige Faktoren. Die Hyaluronsäurekapsel ist ein auf der Bakterienoberfläche lokalisiertes Polysaccharid. Der Verlust der Kapsel durch Mutationen oder enzymatischen Abbau verringert die antiphagozytische Eigenschaft des Bakteriums *in vitro* (Dale, 1996; Foley, 1959) als auch *in vivo* (Ashbaugh, 1998; Husmann, 1997; Medina, 2003). Des Weiteren vermittelt die Kapsel die Bindung von Kollagen IV und die Adhärenz an den humanen Hyaluronsäurerezeptor CD44 (Dinkla, 2003; Cywes, 2001). Des Weiteren verfügt *Streptococcus pyogenes* über zahlreiche Proteasen (SpeB, SIC, DRS, Streptokinase) und Hämolsine (Streptolysin O, Streptolysin S, CAMP Faktor).

### 2.2.3 Bakteriophagenkodierte Virulenzfaktoren

#### 2.2.3.1 Superantigene

Im Verlauf der letzten 25 Jahre wurde ein signifikanter Anstieg von Gruppe A Streptokokken verursachten invasiven Erkrankungen verzeichnet (Stevens, 1989; Johnson, 1992). Es wird angenommen, dass Superantigene eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen. Diese Virulenzfaktoren sind sekretierte Toxine mit pygener Wirkung. Sie führen zu toxischem Schock, unterdrücken die Immunglobulinproduktion und zeigen mitogene Aktivität bei spezifischen T-Zellen (Curtis, 1996). Diese Aktivität führt zu einer extensiven Stimulation des Immunsystems d.h. einer massiven Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Tumor-Nekrose-Faktor alpha, Interleukin-6, Interleukin-2 und gamma-Interferon), was zu einem toxischen Schock und Multiorganversagen führen kann.

Durch die Sequenzierung ganzer Genome von verschiedenen Gruppe A Streptokokken Serotypen wurden zahlreiche Superantigene entdeckt (Ferretti, 2001; Nakagawa, 2003; Banks, 2004; Green, 2005). Insgesamt wurden 11 Superantigene identifiziert: *streptococcal pyrogenic exotoxin* (Spe) A, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, *streptococcal mitogenic exotoxin* (Sme) Z und *streptococcal superantigen* (SSA). Die meisten Superantigene sind bakteriophagenassoziiert, mit Ausnahme von

*speG* und *smeZ*, welche chromosomal kodiert sind (Proft, 2000, 2001 und 2003; Ferretti, 2001). Das Gen *speJ* wird auch als ein chromosomalkodierter Virulenzfaktor diskutiert. Um den Locus dieses Gens befinden sich einige hypothetische, phagenassoziierte Faktoren, jedoch kein Bakteriophage in seiner Gesamtheit.

Es wurde ursprünglich angenommen, dass das Protein SpeB (eine Cysteinprotease) ebenfalls ein Superantigen ist. Der Faktor wird chromosomalkodiert und ist deshalb in fast allen Isolaten zu finden (Meisal, 2009). Die Prävalenz bakteriophagenkodierter Superantigene variiert in verschiedenen geographischen Regionen aber auch temporär. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Serotyp, und damit das M Protein selbst, einen selektiven Einfluss auf die Integration von Bakteriophagen in das Wirtsgenom reflektiert (Mylvaganam, 2000).

Es wird angenommen, dass Phagen zur genetischen Variationen in Gruppe A Streptokokken führen. Einerseits soll dies zu Variationen von Isolaten verschiedener Serotypen führen, andererseits von Isolaten selber Serotypen (2.4.1 Bakteriophagen).

### 2.2.3.2 Weitere phagenassoziierte Faktoren

Neben den bisher beschriebenen pyrogenen Superantigenen können auch andere nicht-pyrogene Faktoren, wie DNasen, die Phospholipase A (*SlaA*), MefA (*macrolide efflux A*) und das Protein R6, bakteriophagenkodiert sein. Die phagenkodierten Faktoren R6 und MefA wurden ausschließlich bei Streptokokken des Serotyps *emm6* beschrieben (Banks, 2003 & 2004). Der Faktor MefA vermittelt eine Resistenz gegenüber Makroliden. Für das Protein R6 konnte bisher nur seine Präsenz auf der Bakterienoberfläche gezeigt werden, funktionelle Charakterisierungen fehlen (Banks, 2003 & 2004). Die Gruppe der DNasen sind potente Virulenzfaktoren. Es wurden bisher die DNasen Sdn, Sda, MF2 und MF3 identifiziert. Diese werden von verschiedenen Prophagen kodiert und treten bei diversen Serotypen auf (Beres, 2002; Ferretti, 2001; Smoot, 2002).

Die sekretierte Phospholipase A wurde erstmalig bei der Genomsequenzierung des M3 Isolates MGAS315 identifiziert (Beres, 2002). Phospholipasen können ein weites Spektrum an Funktionen haben, wie Zytotoxizität, antikoagulierende Aktivität, proinflammatorische Effekte sowie eine bakterizide Aktivität.

## 2.3 Rheumatisches Fieber

### 2.3.1 Kollagen IV Bindung

Akutes rheumatisches Fieber (ARF) ist neben Sepsis und nekrotisierender Fasciitis eine der ernsthaftesten Erkrankungen welche durch Gruppe A Streptokokken verursacht wird. Es tritt als eine Autoimmunfolgeerkrankung von unbehandelter bzw. inadäquat behandelte Pharyngitis auf (Bisno, 1991). Folgen von ARF und der nachfolgenden rheumatische Herzerkrankung sind kardiovaskuläre Schädigungen (World Health Organization, 2004: Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease; Carapetis, 2005). Die schwerwiegendsten Effekte werden bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet (Carapetis, 2005, Kumar, 2002). Mehr als 15 Millionen Menschen leiden weltweit an einer rheumatischen Herzerkrankung. Es treten pro Jahr etwa einen halbe Millionen Neuerkrankungen mit ARF auf. Etwa eine viertel Millionen Todesfälle pro Jahr werden in direkten Zusammenhang mit ARF und einer rheumatischen Herzerkrankung gebracht (World Health Organization, 2004: Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease).

Das rheumatogene Potenzial von Gruppe A Streptokokken wurde in verschiedenen Regionen der Welt beobachtet und korreliert mit bestimmten M Serotypen (Potter, 1978; Majeed, 1986; Stollerman, 1990). Dies indiziert, dass der Hauptvirulenzfaktor M Protein, direkt an der Pathogenese von ARF bzw. einer rheumatischen Herzerkrankung beteiligt ist. Es wurden verschiedene Beobachtungen gemacht, die beschreiben, dass Autoimmunmechanismen zur Entstehung von ARF führen (Carapetis, 2005; Cunningham, 2000; Dinkla, 2003). Hierbei richtet sich die Immunantwort gegen körpereigene Proteine des Herzgewebes (Dinkla, 2003; Kumar, 2002; Tontsch, 2000; Ellis, 2005).

Eine Hypothese ist, dass humanes Kollagen IV, ein Hauptbestandteil der Basalmembran des Subendothels, als ein solches Autoantigen nach der Komplexbildung mit *S. pyogenes* wirkt. Bei Untersuchungen der rheumatogenen Gruppe A Streptokokken wurden das M3 Protein und die Hyaluronsäurekapsel von M18 Isolaten als Interaktionspartner von Kollagen IV identifiziert. Die Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem M3 Protein führte zur Bildung von Kollagen IV Autoantikörpern. Diese wurden ebenfalls im Serum von Patienten mit ARF bzw. rheumatischer Herzerkrankung gefunden. Die direkte Bindung von Kollagen IV auf der Bakterienoberfläche von Streptokokken wird deshalb als einer der Schlüsselmechanismen in der Entstehung von ARF betrachtet.

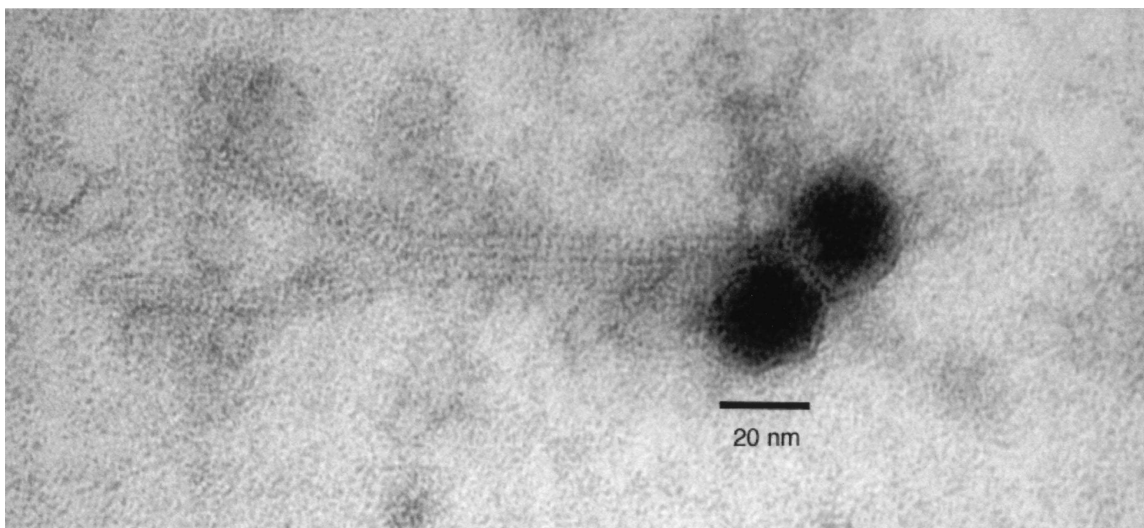
Weiterführende Studien identifizierten eine Sequenz von acht Aminosäuren (A/E/T)XYLXXLN als Kollagenbindungsmotiv, das sogenannte PARF-Motiv (*peptide associated with rheumatic fever*). Dieses Motiv vermittelt die Bindung der CB3 Region von Kollagen IV (Dinkla, 2009) an das M3 Protein von *S. pyogenes* und FOG von *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Dinkla, 2007; Barroso, 2009).

## 2.4 Mobile genetische Elemente

Zu den mobilen genetischen Elementen zählt man Bakteriophagen, Plasmide und transponierbare genetische Elemente, wie Insertionselemente und Transposons. Auf die transponierbaren genetischen Elemente soll im Folgenden nicht weiter eingegangen werden. Zu bemerken ist jedoch, dass es Transposons bei Gruppe A Streptokokken gibt, wie z. B. das Tn917-like Transposon, welches die Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin vermittelt (Brenciani, 2007).

### 2.4.1 Bakteriophagen

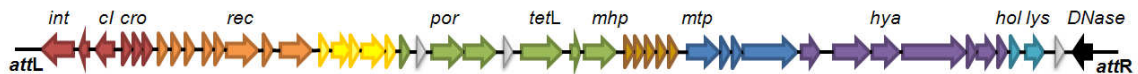
Zahlreiche bakterielle Genome weisen Phagen-DNA auf. Es ist nicht ungewöhnlich, dass mehrere Prophagen im bakteriellen Chromosom integriert vorliegen. Diese können damit eine beachtliche Größe des gesamten Chromosoms ausmachen. Im Genom von *Streptococcus pyogenes* können bis zu acht Prophagen integriert sein, welche somit ca. 12% des bakteriellen Chromosoms repräsentieren. Bakteriophagen von *Streptococcus pyogenes* gehören zu den Gruppen Sfi11-, Sfi21- und r1t-like *Siphoviridae*. Merkmale dieser Gruppen sind ein langes, nicht-kontraktilen Schwanzteil und ein ikosaedrisches Kapsid (Abbildung 2.3). Als mobiles genetisches Element stellt die Phagen-DNA einen wichtigen Vektor für den lateralen Gentransfer zwischen den Bakterienisolaten dar.



**Abbildung 2.3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Phagenpartikeln aus dem Kulturüberstand des Streptokokkenisolats MGAS315. (Banks, 2003).

Zahlreiche Virulenzfaktoren von *Streptococcus pyogenes* sind bakteriophagenkodiert (siehe 2.2.3 Bakteriophagenkodierte Virulenzfaktoren). Des Weiteren sind Prophagen für eine enorme genetische Variabilität in der Spezies *Streptococcus pyogenes* verantwortlich. Microarrayanalysen zeigten, dass Prophagen nicht nur eine signifikante Quelle genomischer Diversität zwischen den Serotypen darstellen, sondern weiterhin für eine Variabilität innerhalb eines Serotyps verantwortlich sind. Zum Beispiel unterscheiden sich Isolate des Serotyps M18 in lediglich 3% der Gene, wobei Prophagen für fast alle Variationen der genetischen Ausstattung verantwortlich waren. Diese Variationen reichten von der Abwesenheit ganzer Prophagen bis hin zu kleineren Unterschieden in der Genausstattung der Phagen (Smoot, 2002).

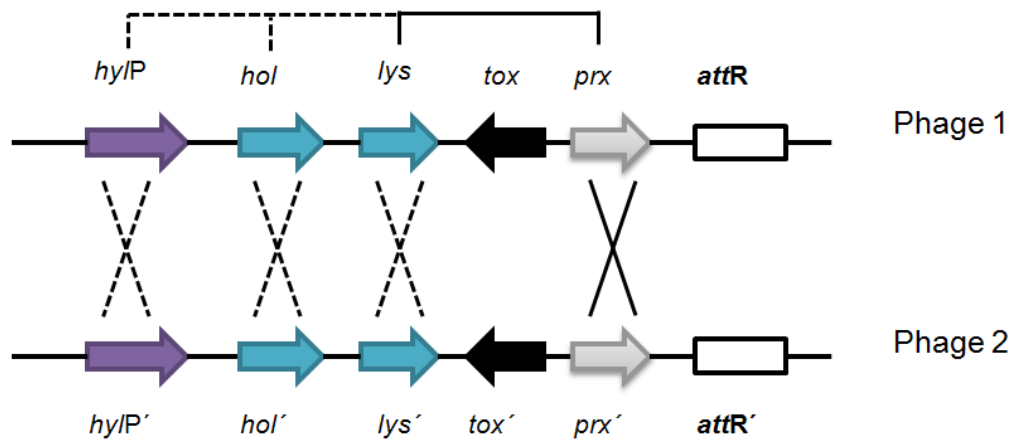
Alle bisher bekannten Prophagen von Milchsäurebakterien und somit auch die Prophagen von Gruppe A Streptokokken zeigen eine konservierte Genanordnung. Die Phagen lassen sich in folgende Module unterteilen: linke *attachment site* (*attL*) – Proteine der DNA-Replikation und Lysogenie – Transkriptionsregulatoren – DNA-Verpackung und Kopfproteine – Kopf-Schwanz-Verbindung – Schwanzproteine – Schwanzfasern – Proteine für Lyse des Wirtes – rechte *attachment site* (*attR*) (Abbildung...).



**Abbildung 2.4: Schematische Abbildung des r1t-like Bakteriophagen  $\Phi$ 370.3 des Streptokokkenisolates MGAS370.** Die Module des Prophagen sind farbkodiert. Proteine der Lysogenie, rot; Proteine für DNA-Replikation, orange; Transkriptionsregulatoren, gelb; Proteine für DNA-Verpackung und Kopfproteine, grün; Kopf-Schwanz-Verbindung, braun; Schwanzproteine, blau; Schwanzfasern, violett; Lyse des Wirtes, hellblau; Virulenzfaktor DNase, schwarz, ohne zugeordnete Funktion, grau. Selektierte Gene wurden annotiert: *int*, Integrase; *cI/cro*, Repressoren; *rec*, Replikation; *por*, Portal; *terL*, große Untereinheit der Terminase; *mhp/mtp*, Hauptkopf/-schwanzprotein; *hya*, Hyaluronidase, *hol*, Holin; *lys*, Lysin.

Es wurden 11 verschiedene Integrationsstellen bei den sequenzierten Isolaten SF370, MGAS315 und MGAS8232 identifiziert. Alle bis auf einen Bakteriophagen ( $\Phi$ 315.1) dieser Isolate kodieren potentielle Virulenzfaktoren zwischen den Lysingenen und der rechten *attachment site* (Toxine/Superantigene, DNasen, Enzyme) (Banks, 2002; Ferretti, 2001). Durch die Genomsequenzierung weiterer Isolate von *Streptococcus pyogenes* konnten weitere Integrationsstellen im Genom identifiziert werden, so dass heutzutage 16 bekannte Integrationsstellen existieren.

Die Integration von Prophagen stellt somit einen der Hauptmechanismen der kurzfristigen Evolution von *Streptococcus pyogenes* dar. Das Auftauchen eines neuen, sehr virulenten Subklones eines M3 Isolates wird durch die Integration der Prophagen  $\Phi$ 315.5,  $\Phi$ 315.2 und  $\Phi$ 315.4 in den Jahren 1920, 1940 und 1985 erklärt (Beres, 2002).



**Abbildung 2.5: Hypothetisches Modell für den Austausch von Toxingenen zwischen Bakteriophagen.** Durch homologe Rekombination könnten Toxingene bzw. andere Virulenzfaktoren zwischen verschiedenen Prophagen ausgetauscht werden. Die Hauptstellen der Rekombination sind auf beiden Seiten der Toxingene (*tox*) abgebildet. Eines ist das Paratoxin (*prx*). Mögliche Gene für die Rekombination wären die Gene für Hyaluronidasen (*hylP*), Holine (*hol*) oder Lysine (*lys*).

Wie schon erwähnt, befinden sich die potentiellen Virulenzfaktoren zwischen den Lysingenen (*lys*) und der rechten attachment site (*attR*). Weitere Gene in unmittelbarer Nähe sind die Gene *hylP* (Hyaluronidase), *hol* (Holin) und *prx* (Paratoxin). Vergleicht man die Nukleotidsequenzen dieser links und rechts der Toxingene (*tox*) gelegenen Gene der sequenzierten Streptokokkengenome, zeigen sich hoch konservierte Abschnitte. Diese Entdeckung führte zum Modell der homologen Rekombination, bzw. dem Austausch von Toxingenen zwischen verschiedenen Bakteriophagen (Abbildung 2.5).

### 2.4.2 Natürlich vorkommende Plasmide

Plasmide sind mobile genetische Elemente, die unabhängig vom Wirtschromosom replizieren. Sie können mehrere Gene enthalten, wobei jedes Plasmid mindestens eine Sequenz enthält, die als Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI) dient. Die Art des Replikationsursprungs bestimmt wie viele Kopien des Plasmids pro Bakterienzelle vorliegen. Man unterscheidet *low-copy* (1 – 3 Kopien) und *high-copy* (mit bis zu 100 Kopien) Plasmide. Natürlich vorkommende Plasmide variieren in ihrer Größe von ungefähr 1 bis mehr als 1000 Kilobasen. Bei der Spezies *Streptococcus pyogenes* wurden bisher drei kleine Plasmide, mit einer Größe bis 5 Kilobasen, und drei größere Plasmide, mit einer Größe von ca. 19 bis 29 Kilobasen, entdeckt (Tabelle 2.2). Die meisten Plasmide grampositiver Bakterien replizieren nach dem *rolling circle* Mechanismus.

Obwohl Plasmide keine Gene tragen, die für den Wirt unter allen Bedingungen notwendig sind, kann das Vorhandensein von Plasmiden in einer Zelle einen großen Einfluss auf ihren Phänotyp haben. Man unterscheidet, auf Grundlage der enthaltenen Gene, zwischen kryptischen Plasmiden und Resistenzplasmiden, sowie Plasmiden, welche Bakteriocine, Toxine oder andere Virulenzfaktoren kodieren.

**Tabelle 2.2: Übersicht der bisher beschriebenen Plasmide bei Gruppe A Streptokokken**

Spezies	Faktor	Größe	Serotyp	Referenz
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pRW35</b>	<i>ermT</i>	4962 bp	<i>emm92, emm3, emm9, emm28</i>	Woodbury, 2008
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pDN571</b>	Streptococcin A-M57	3351 bp	<i>emm57</i>	Heng, 2004
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pDN281</b>	Dysgalacticin	3041 bp		Heng, GenBank: AY995189
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pA15</b>	<i>ermA, ermB</i>	~ 19000 bp	19 verschiedene Serotypen	Liu, 2007
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pSM19035</b>	<i>ermA, ermB</i>	28975 bp		Kern-Zdanowicz, GenBank: AY357120
<i>Streptococcus pyogenes</i> Plasmid <b>pDB101</b>	<i>ermA, ermB</i>	19202 bp		Cegłowski, 1994

Im Allgemeinen sind Resistenzplasmide (R-Plasmide) am weitesten verbreitet und am besten untersucht. Ein R-Plasmid kann eine Reihe von Resistenzgenen gegen Antibiotika tragen. Diese Resistenzgene kodieren Proteine, die entweder das Antibiotikum inaktivieren oder seine Aufnahme in die Zelle beeinflussen.

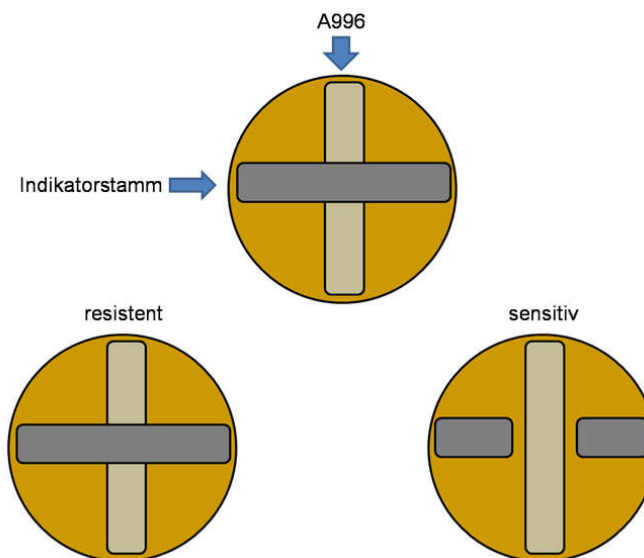
Bei Streptokokken der pyogenen Gruppe wurden Plasmide entdeckt, welche durch die Gene *ermA*, *ermB* (Cegłowski, 1994) bzw. *ermT* (Woodbury, 2008) eine Resistenz gegen Macrolide, Lincosamide und Streptogramin B zeigen.

Viele Bakterien produzieren antibiotisch wirksame Proteine, die eng verwandte Arten oder sogar andere Stämme der gleichen Art hemmen oder abtöten. Diese Agenzien werden Bakteriocine genannt, um sie von den Antibiotika zu unterscheiden, welche ein breiteres Wirkungsspektrum haben. Bei *Streptococcus pyogenes* wurden bisher zwei plasmidkodierte Bakteriocine identifiziert.

Dysgalactacin, ursprünglich bei der Spezies *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* entdeckt (Heng, 2006), zeigt ein eher eingeschränktes Wirkspektrum und ist hauptsächlich gegen *Streptococcus pyogenes* wirksam (Swe, 2009). Im Gegensatz dazu hat Streptococcin A-M57 (SA-M57) keinen inhibitorischen Effekt auf Gruppe A Streptokokken, zeigt aber Aktivitäten bei anderen grampositiven Spezies, wie *Micrococcus luteus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus simulans*, *Listeria grayii*, and *Enterococcus hirae* (Heng, 2004). Das Bakteriocin SA-M57 wurde bei Streptokokken des Serotyps M57 gefunden. Über das Vorkommen von Dysgalactacin liegen keine Daten vor.

### Methoden zur Antagonismus-Demonstration

Zur Demonstration dieses bakteriocinogenen, inhibitorischen Effekts auf andere Bakterien wird ein Wachstumsinhibitions-Assay auf Agarplatten durchgeführt. Bei diesem Assay kann eine Wachstumsinhibition der (passiven) Indikatorstämme verursacht durch den (aktiven) Teststamm beobachtet werden.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Wachstumsinhibitionsversuchs.** Der Teststamm A996 wird hierfür auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach einer definierten Kultivierungsphase wird dieser mit Agarmedium überschichtet. Der Indikatorstamm wird danach orthogonal zum Teststamm ausgestrichen. Nach erneuter Kultivierung wird das Wachstum des Indikatorstamms betrachtet.



Diese Methode wurde durch Fredericq (Fredericq, 1948) entwickelt und bei späteren Bakteriocintypisierungen von anderen Gruppen weiterentwickelt (Abbott, 1958; Tagg, 1979). Der Teststamm wird hierfür auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach einer definierten Kultivierungsphase wird der Großteil der Bakterien von der Platte abgenommen. Die auf der Platte verbleibenden Bakterien werden durch Chloroformgas abgetötet. Der Indikatorstamm wird nach dem Verdampfen des Chloroforms orthogonal zum Teststamm ausgestrichen. Nach einer erneuten Kultivierungsphase wird das Wachstum des Indikatorstamms betrachtet. Ein potentieller Nachteil dieser Methode ist, dass manche inhibitorische Agenzien durch Chloroform inaktiviert werden können, so z. B. ein Bakteriocin, welches von *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* produziert wird (Brock, 1963). Um dieses Problem zu umgehen, kann der Teststamm auch mit Agarmedium überschichtet und der Indikatorstamm im Anschluss ausgestrichen werden (Abbildung 2.6). Durch diese *screening* Methode erhält man preliminäre Informationen zur Identifikation eines möglicherweise bakteriocinogenen Bakteriums.

## 2.5 Genotypisierung von Streptokokken mit einem individuell gefertigten DNA-Microarray

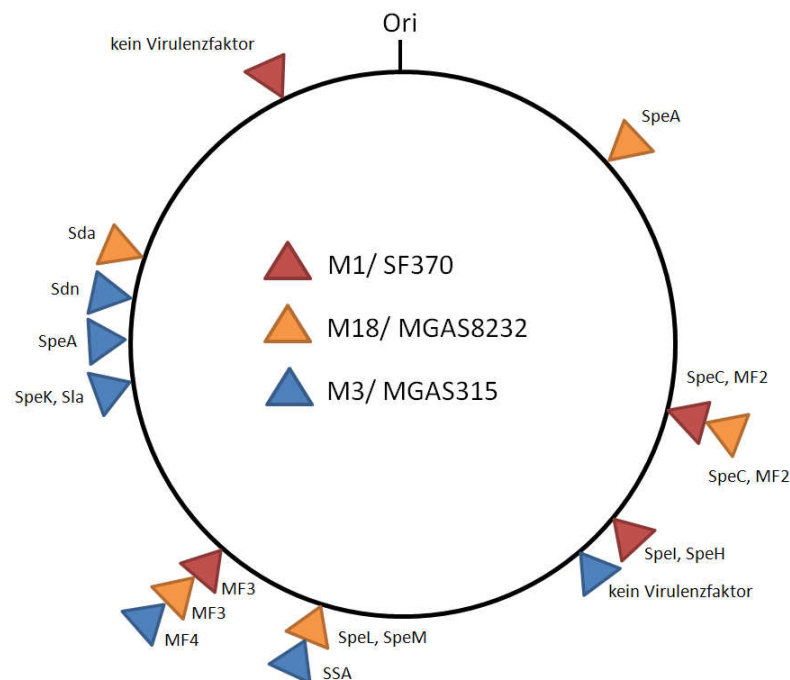
In den letzten 25 Jahren wurde ein Anstieg der Inzidenz von invasiven Gruppe A Streptokokken in industrialisierten Ländern beobachtet (Kisk, 1997; Carapetis, 1995; Vlamincx, 2004). Die Faktoren, welche zu diesem Wiederauftreten von schwerwiegenden Streptokokkenerkrankungen führen sind unklar. Es wird postuliert, dass eine veränderte genetische Ausstattung zu diesem Anstieg invasiver Erkrankungen führte (Musser, 1995; Aziz, 2005; Sumby, 2005). Es konnte aber kein Zusammenhang von spezifischen Genen und dem Auftreten einer invasiven Erkrankung gefunden werden (Chatellier, 2000; Schmitz, 2003; Delvecchio, 2002; Musser, 1993). Diskutiert werden häufig phagenassoziierte Faktoren, wie die *streptococcal exotoxins speA* und *speC* (Descheemaeker, 2000; Hauser, 1991), welche durch horizontalen Gentransfer übertragen werden. Da diese Studien zu keinem Konsensus führten, liegt es nahe, dass bisher nicht identifizierte bzw. nicht charakterisierte Faktoren für den Ausbruch bestimmter Erkrankungen führen oder der Wirt eine entscheidende Rolle spielt.

Mit der Hilfe eines Microarrays kann das Genrepertoire bzw. die genetische Ausstattung von zahlreichen Isolaten schnell und effektiv analysiert werden. Dies hat gegenüber bisherigen Methoden, wie z.B. der PCR den Vorteil, dass die Präsenz von über hundert Faktoren durch ein Experiment analysiert werden kann. Durch die Verwendung von individuell gefertigten Arrays ist es möglich, mehrere Genomsequenzen als Grundlage zu verwenden. Dadurch können isolatspezifische, einzigartige offene Leseraster mit einbezogen werden, welche durch die Verwendung eines Vollgenomchips eines Isolates nicht analysiert werden könnten.

Der hier verwendete DNA-Microarray wurde von David McMillan (McMillan, 2006) entwickelt. Als Grundlage dienten die Genomsequenzen der *S. pyogenes* Isolate MGAS315 (Beres, 2002), SF370 (Ferretti, 2001) und MGAS8232 (Smoot, 2002). Diese haben die Serotypen *emm3*, *emm1* und *emm18*. Es wurden (Virulenz-)Faktoren ausgewählt, deren Proteinsequenzen Motive enthalten, die auf eine extrazelluläre Lokalisation deuten (Signalpeptidsequenz, Vorhandensein einer Transmembrandomäne (Nielsen, 1997 und 1998, Hirokawa, 1998)).

Isolate des Serotyps *emm1* treten mit ca. 18% am häufigsten in den industrialisierten Ländern auf und verursachen vorwiegend Pharyngitis und invasive Erkrankungen (Steer, 2009). Serotyp *emm18* hingegen wird weniger häufig isoliert, ist aber mit dem Ausbruch von akutem rheumatischen Fieber in den USA assoziiert (Musser, 1998). Der Serotyp *emm3* wird mit ungewöhnlich schwerwiegenden Infektionen assoziiert, wobei die Mortalität sehr hoch ist (Musser, 1991). Wie in Abbildung 2.7 zu erkennen ist, besitzen die drei ausgewählten Isolate ein unterschiedliches Repertoire an Bakteriophagen, und somit auch isolatspezifische Virulenzfaktoren. Das sequenzierte

M1 Isolat SF370 besitzt z. B. das phagenkodierte Exotoxin *speA* nicht, ein potentes Superantigen, welches mit invasiven Erkrankungen in Verbindung gebracht wird



**Abbildung 2.7: Schematische Abbildung des GAS Kerngenoms, Integrationsstellen von Prophagen im Wirtschromosom und phagenkodierte Virulenzfaktoren.** Der Kreis repräsentiert das GAS Chromosom. Die Prophagenelemente werden durch farbige Dreiecke wiedergegeben, welche den Wirtsstamm angeben. MF, *mitogenic factor*; Sda, Streptodornase; Sdn, Streptodornase; Sla, Phospholipase A<sub>2</sub>; Spe, *streptococcal pyrogenic exotoxin*; SSA *streptococcal superantigen A*

(Ferretti, 2001; Musser, 1991). Serotyp M3 (MGAS315) hingegen besitzt *speA* und ein weiteres Gen (*ssa*) für das Superantigen *streptococcal superantigen A* (Reda, 1994 und 1996; Stevens, 1996). Das Gen *sda*, welches eine Streptodornase kodiert, ist nur im M18 Isolat MGAS8232 zu finden. Des Weiteren sind die Gene *speL* und *speM*, welche weitere Exotoxine kodieren, nur in dem M18 Isolat zu finden.

Durch die Auswahl dieser drei Isolate als Referenzstämme für den Array, wurde ein breites Spektrum an phagenkodierenden Virulenzfaktoren abgedeckt. Des Weiteren besitzt jedes Isolat einzigartige offene Leseraster, welche in den Array mit eingeflossen sind. Für den Microarray wurden insgesamt 219 Gene ausgewählt. Diese Gene kodieren Virulenzfaktoren bzw. extrazelluläre Proteine, welche sich in sechs Gruppen unterteilen lassen: Adhäsine (12 Gene), Fibronektinbindungsproteine (7 Gene), Proteasen (7 Gene), Hämolyse (6 Gene), andere Virulenzfaktoren (chromosomalkodiert: 17, phagenassoziiert: 14) und zahlreiche hypothetische extrazelluläre Proteine.

Durch die Studien von McMillan (McMillan, 2007) wurde mit Hilfe dieses Arrays gezeigt, dass kein Streptokokkenisolat totipotent für alle untersuchten Virulenzgene ist bzw. die Virulenzgenprofile sehr stark variieren. Im Allgemeinen zeigten die Profile von Isolaten mit demselben Serotyp nur geringe Unterschiede im Virulenzgenrepertoire. Beim Vergleich von Isolaten verschiedenster Serotypen wurde jedoch ein Kerngenom identifiziert, welches in allen Isolaten detektiert wurde. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Gene hochkonserviert in der Streptokokkenpopulation vorliegen und somit fundamental für das Überleben und die Pathogenese sind. Diese Gruppe von Genen kodieren Proteasen und die meisten Toxine (mit Ausnahme der Exotoxine). Im Gegensatz dazu zeigten die Adhäsine und bakteriophagenkodierte Faktoren die größte Variation in der Gendistribution. Es wurden jedoch keine Gene identifiziert, welche mit invasiven Erkrankungen assoziiert sind. Dies führte zu der Annahme, dass verschiedene Allele (Sumby, 2006; Nordstrand, 2000) oder Wirtsfaktoren, wie Variationen des Haplotyps, einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung haben (Ahmed, 1998; Shulman, 2002).

Der Array ist somit ein wirkungsvolles Hilfsmittel zur Analyse von molekularepidemiologischen Merkmalen, da es möglich ist, schnell und effektiv das Virulenzgenrepertoire von zahlreichen Isolaten zu analysieren. Durch computergestützte Analysen können Unterschiede im Genrepertoire verschiedener Gruppen (sortiert nach Serotyp, Isolationsquelle, geographische Region) festgestellt werden.

### 2.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die molekularepidemiologische Charakterisierung von indischen Gruppe A Streptokokkenisolate, die in zwei unterschiedlichen geographischen Regionen Indiens isoliert wurden, sein. Untersuchungen in verschiedenen Industrie- und Entwicklungsländern zeigten, dass es große regionale Unterschiede im Antigenprofil und der Distribution von Virulenzmerkmalen gibt. Im Gegensatz zu den industrialisierten Ländern gibt es für Indien nur wenige umfassende Studien zu diesem Thema.

Mit Hilfe eines individuell gefertigten Microarrays sollte die Distribution von charakterisierten bzw. putativen (Virulenz-) Faktoren untersucht werden. Die aufgrund dieser Daten erhaltene Klassifizierung der Isolate in sogenannte Virulenzfaktorprofile sollte mit der klassischen *emm* Typisierung verglichen werden. Ein Schwerpunkt der betrachteten Virulenzfaktoren sollte die Gruppe der Superantigene darstellen. Die Distribution dieser Faktoren sollte neben dem Microarray mittels PCR bestimmt werden, um die Validität der Microarraydaten zu überprüfen.

Des Weiteren sollte die Kollagen IV-Bindung der Streptokokkenisolate untersucht werden, da dies als ein Schlüsselmechanismus in der Entstehung von ARF betrachtet wird. Mögliche Interaktionspartner neben dem M3 Protein und der Hyaluronsäurekapsel sollten näher charakterisiert werden.

Neben den auf dem Array vertretenen Faktoren sollte die Präsenz von Plasmiden und deren serotypabhängige Distribution untersucht werden. Der Vergleich der Co-Detektionen der publizierten Gene *repB/dysA* und *repA/Streptococcin A* sollten Hinweise auf das Vorhandensein bisher unbekannter Plasmide geben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 M Protein-Gen (*emm*) Typisierung von *S. pyogenes*

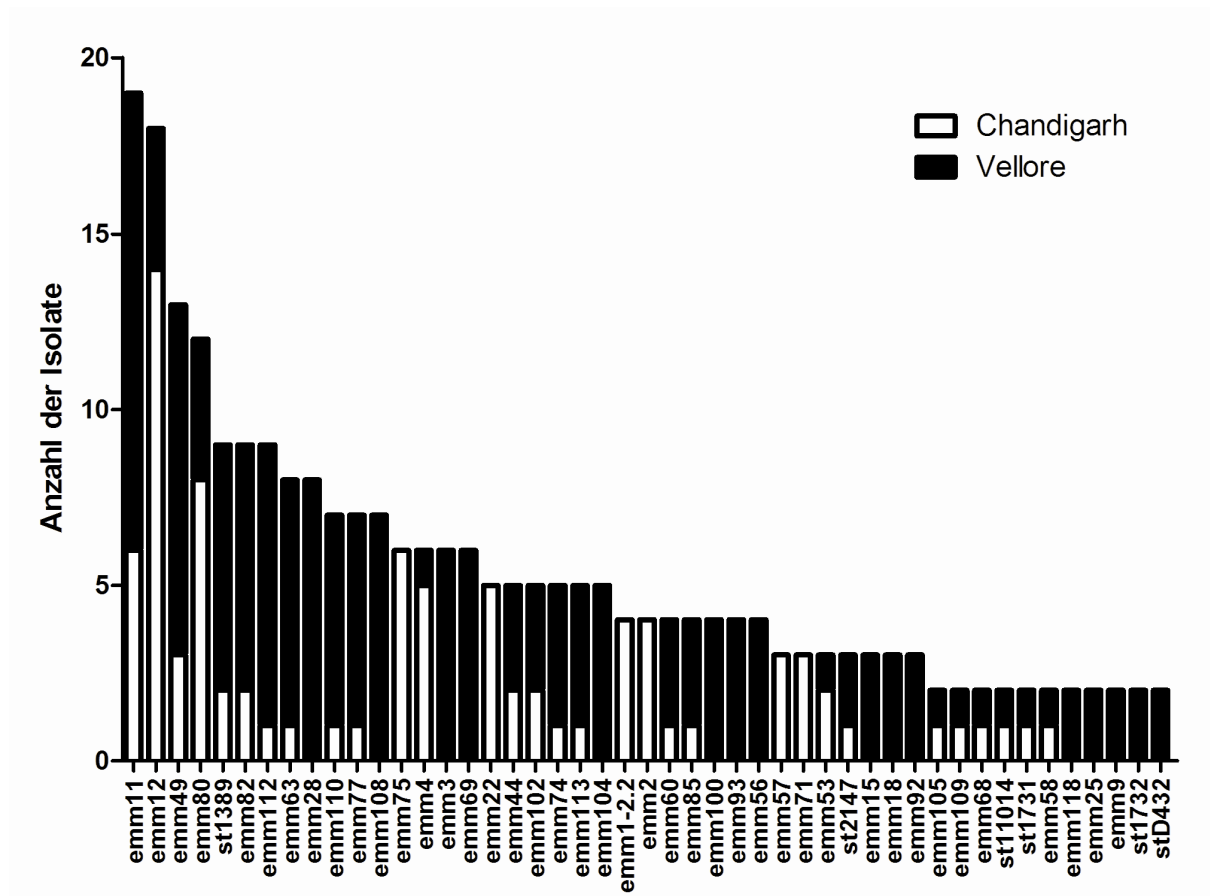
Durch die Entwicklung der sequenzbasierten *emm*-Typisierung konnten umfangreiche epidemiologische Studien, vor allem in den USA, Kanada und Europa durchgeführt werden (O’Loughlin, 2007; Lamagni, 2005; Shulman, 2004; Tanz, 2005). Unterschiede in der Verteilung von *emm*-Typen zwischen regionalen Bereichen der Erde sind schon länger bekannt (O’Loughlin, 2007; Bessen, 2000). Daten über die Distribution der *emm*-Typen in Assoziation mit einer Krankheit sind für Indien hingegen nur in geringem Maße publiziert. Sagar (Sagar, 2008) untersuchte zum Beispiel die *emm*-Typ Distribution von Gruppe A Streptokokkenisolaten aus Chandigarh (Nordindien). Es wurden 37 verschiedene *emm*-Typen (bei 94 Isolaten) gefunden, jedoch gab es keine signifikante Assoziation von Serotyp und Erkrankung (Rachen und Haut). Die Ergebnisse der Arbeit zeigten aber, dass die am häufigsten vorkommenden Serotypen in Chandigarh nicht mit den prävalenten Serotypen in Deutschland, Australien, den USA oder Japan übereinstimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher im Folgenden die *emm*-Typ Distribution zweier indischer Regionen untersucht und miteinander verglichen werden. Im Anschluss sollen diese Daten mit den bekannten Distributionen der *emm*-Typen der industrialisierten Länder verglichen und diskutiert werden.

Zum Großteil sind die hervorgerufenen Erkrankungen der in dieser Arbeit verwendeten Gruppe A Streptokokken bekannt. Es wurden Abstriche aus dem Rachen (symptomatisch bzw. asymptomatisch), von der Haut und invasiver Erkrankungen analysiert.

### 3.1.1 *emm*-Typ Distribution von Gruppe A Streptokokken in Indien

Die im Rahmen des ASSIST-Projektes (Comprehensive approach to understand streptococcal diseases and their sequelae to develop innovative strategies for diagnosis, therapy, prevention and control) isolierten Gruppe A Streptokokken (n=279) stammen aus zwei unterschiedlichen Regionen in Indien. Als Teil der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung der Serotypen die *emm* Gene amplifiziert. Die Sequenzierung wurde durch die Abteilung „Genomanalyse“ des HZI durchgeführt. In Chandigarh (Nordindien) wurden 96 Isolate mit 45 verschiedenen *emm*-Typen isoliert. In Vellore (Südindien) wurden 184 Isolate mit 70 verschiedenen *emm*-Typen isoliert. Insgesamt traten 91 verschiedene *emm*-Typen auf, welche 77 M Proteine (ohne Subtypen) kodieren. Die folgenden Daten beziehen sich auf Serotypen ohne Subtypen (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Distribution der Serotypen von Gruppe A Streptokokken in Indien.** Bei den 279 isolierten Gruppe A Streptokokken aus Chandigarh (Nordindien) und Vellore (Südindien) wurden 77 verschiedene Serotypen (ohne Subtypen) festgestellt. Serotypen mit weniger als zwei Isolaten wurden nicht aufgeführt.

Der Serotyp *emm11* wurde mit 6,76% am häufigsten isoliert, gefolgt von *emm12* (6,41%), *emm49* (4,63%) und *emm80* (4,27%). Die restlichen Serotypen machten weniger als 4% der Gesamtzahl der Isolate aus. Die häufigsten 16 Serotypen sind für 53,4% aller isolierten Gruppe A Streptokokken verantwortlich. Die restlichen 46,6% umfassten 61 verschiedene Serotypen.

In Chandigarh entsprachen 8 Serotypen 53,6% der nordindischen Isolate, die restlichen 46,4% wurden durch 34 Serotypen vertreten. Mit 14,43% wurde der Serotyp *emm12* am häufigsten isoliert, gefolgt von *emm80* (8,25%), *emm11* und *emm75* (6,19%), *emm4* und *emm22* (5,15%), *emm1-2.2* und *emm2* (4,12%).

In Vellore entsprachen 13 Serotypen 52,2% der südindischen Isolate, die restlichen 47,8% wurden durch 47 Serotypen vertreten. Mit 7,07% wurde der Serotyp *emm11* am häufigsten gefunden, gefolgt von *emm49* (5,43%), *emm112* und *emm28* (4,35%), *st1389*, *emm82*, *emm63* und *emm108* (3,8%), *emm110*, *emm77*, *emm3* und *emm69* (3,26%) und *emm104* (2,72%).

Der Serotyp *emm11* trat als einziger Serotyp in beiden indischen Regionen häufig auf. Unter den am häufigsten isolierten Gruppe A Streptokokken wurden die Serotypen *emm28*, *emm108*, *emm3*, *emm69* und *emm104* nur in Südindien und die Serotypen *emm75*, *emm1-2.2* und *emm2* nur in Nordindien isoliert (Abbildung 3.1).

Die restlichen häufig auftretenden Serotypen sind in beiden indischen Regionen vertreten, jedoch ist die Gewichtung eine andere. So traten die Serotypen *emm12* und *emm80* mit 14 (14,43%) bzw. 8 (8,25%) Isolaten am häufigsten in Nordindien auf. In Südindien hingegen wurden nur jeweils 4 Isolate (2,17%) dieser Typen gefunden. Die Serotypen *emm49* (10 Isolate), *emm112* und *emm28* (jeweils 8 Isolate) traten in Südindien häufig auf, im Norden hingegen wurden diese Serotypen nur sehr selten bzw. überhaupt nicht isoliert.

#### **3.1.2 Isolationsquelle der Gruppe A Streptokokken**

Die in Indien isolierten Gruppe A Streptokokken verursachten invasive Erkrankungen (15,77%), Pharyngitis (8,6%) und Infektionen der Haut (15,41%). Des Weiteren wurden Isolate aus dem Rachen (asymptomatisch; 15,41%) entnommen (Tabelle 3.1). Im Verlauf invasiver Erkrankungen wurden 44 Isolate mit 31 verschiedenen *emm*-Typen isoliert (s. Anhang Tabelle 6.3). Am Häufigsten traten die Serotypen *emm49.0* (4 Isolate) und *emm80.0* (4), *emm12.0* (3) und *emm28.5* (3) auf, gefolgt von *emm113.0* (2), *emm1-2.2* (2) und *emm74.0* (2). Die restlichen 24 Serotypen traten mit lediglich einem Isolat auf.



**Tabelle 3.1: Isolationsquelle der Gruppe A Streptokokken.** Es wurden insgesamt 280 Gruppe A Streptokokken isoliert. Abgebildet sind die Anzahl und das prozentuale Vorkommen in der jeweiligen Region Indiens.

	Rachen	Pharyngitis	Haut	Invasiv	unbekannt	gesamt
Chandigarh	41 (42,71%)	14 (14,58%)	20 (20,83%)	13 (13,54%)	8 (8,33%)	96
Vellore	21 (11,48%)	10 (5,46%)	23 (12,57%)	31 (16,94%)	98 (53,55%)	183
<b>Gesamt</b>	<b>62 (15,41%)</b>	<b>24 (8,6%)</b>	<b>43 (15,41%)</b>	<b>44 (15,77%)</b>	<b>106 (38,0%)</b>	<b>279</b>

Bei näherer Betrachtung wurde festgestellt, dass 75,0% der Isolate mit dem Serotyp *emm28.5* bzw. 66,66% der Isolate mit dem Serotyp *emm49.0* bei invasiven Erkrankungen isoliert wurden. Die Subtypen *emm28.0* (4 Isolate) und *emm49.4* (7) hingegen wurden nicht bei invasiven Erkrankungen isoliert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass 33,33% der *emm80.0* Isolate und 21,43% der Isolate mit dem Serotyp *emm12.0* bei invasiven Erkrankungen isoliert wurden. Zu bemerken ist, dass alle weiteren Isolate des Serotyp *emm12.0* aus dem Rachenraum entnommen wurden.

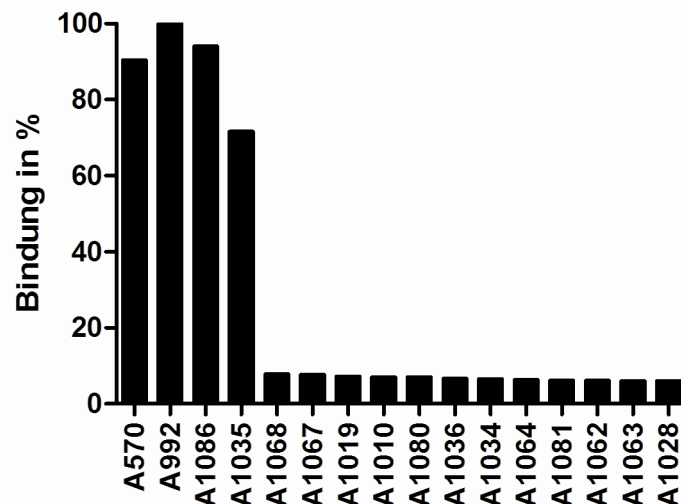
Zusammenfassend war festzustellen, dass es keine Assoziation zwischen invasiver Erkrankung und *emm*-Typ gab. Einige Serotypen waren mit einer bestimmten Isolationsquelle assoziiert, allerdings war häufig die Probenanzahl zu gering, um aussagekräftige Verknüpfungen zu erkennen. Der Serotyp *emm12* wurde ausschließlich im Rachen oder im Verlauf invasiver Erkrankungen isoliert. Der Serotyp *emm80* hingegen wurde aus dem Rachen, von der Haut und bei invasiven Erkrankungen isoliert.

## 3.2 Kollagen IV Bindung

Akutes rheumatisches Fieber (ARF) und dessen Folgeerkrankungen korrelieren mit bestimmten M Serotypen (Dinkla, 2003; Potter, 1978; Majeed, 1986; Stollerman, 1990). Dies indiziert, dass der Hauptvirulenzfaktor M Protein direkt bei der Pathogenese von ARF bzw. einer rheumatischen Herzerkrankung beteiligt ist. Bisher wurden das M3 Protein und die Hyaluronsäurekapsel von M18 Isolaten als Interaktionspartner von Kollagen IV identifiziert. Die direkte Bindung von Kollagen IV auf der Bakterienoberfläche von Streptokokken wird als einer der Schlüsselmechanismen in der Entstehung von ARF betrachtet, weshalb die Kollagen IV-Bindung der indischen Isolate näher untersucht wurde.

### 3.2.1 Untersuchung der Kollagen IV-Bindung indischer Isolate

Es wurden 256 Isolate in einem radioaktiven  $^{125}\text{I}$ -Kollagen IV-Bindungsassay getestet. Abbildung 3.2 zeigt die prozentuale Kollagenbindung der nordindischen Isolate. Es wurden drei von 90 Isolate gefunden (3,3%), die eine Kollagen IV-Bindung zeigten.

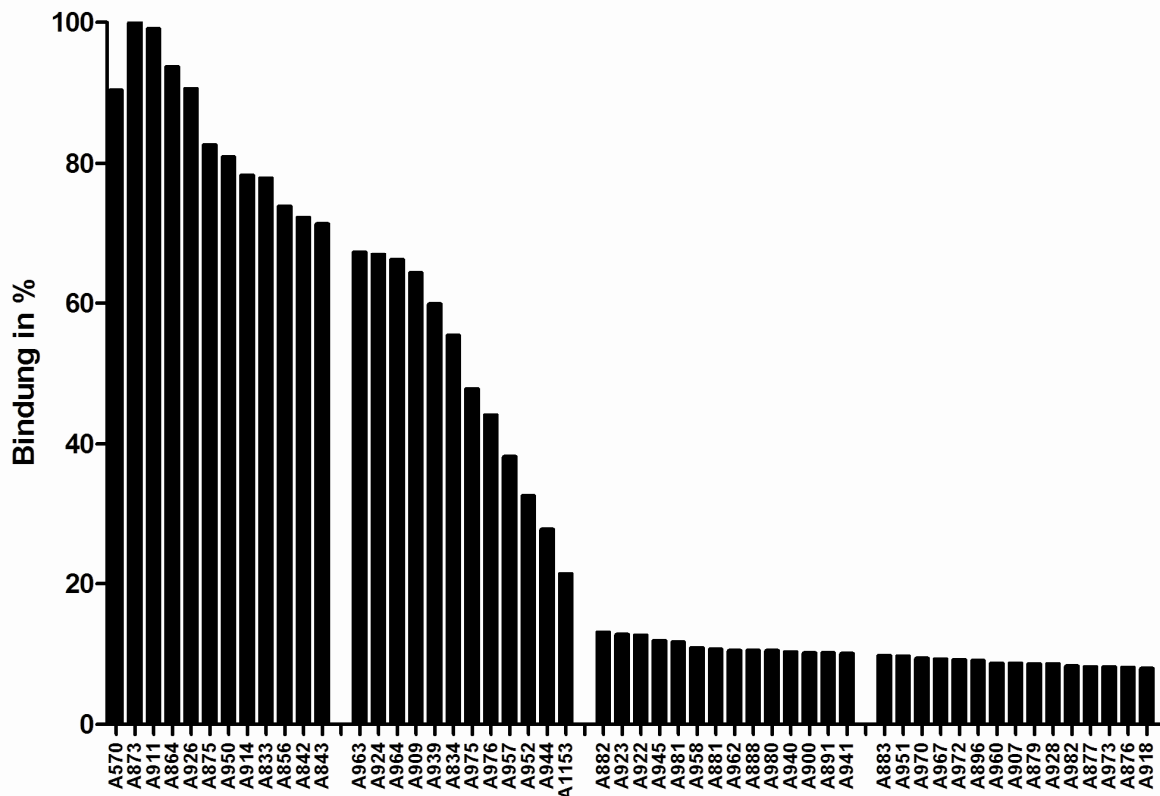


**Abbildung 3.2:**  $^{125}\text{I}$ -KollagenIV-Bindung der nordindischen Isolate. Die Isolate A992 (*emm116*), A1086 (*emm74*) und A1035 (*emm80*) zeigten hohe Bindungswerte. Das Isolat A570 (*emm3*) diente als Positivkontrolle. Die verbleibenden 87 Isolate zeigten keine Bindung. Exemplarisch sind nur einige Isolate abgebildet.

Diese Isolate gehören den Serotypen *emm116*, *emm80* und *emm74* an. Bei den beiden erstgenannten Serotypen wurde eine hyaluronsäurekapselvermittelte Bindung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Der Serotyp *emm74* wird später eingehender betrachtet. Die verbleibenden 87 Isolate zeigten keine Bindung, exemplarisch sind nur einige Isolate graphisch dargestellt.

Bei den Gruppe A Streptokokken aus Vellore (Abbildung 3.3) zeigten 24 der 166 Isolate (14,46%) eine Kollagenbindung über 20%. Es traten die Serotypen M3, M15, M25, M42, M69, M74 und M105 auf. Es wurde festgestellt, dass nicht alle Isolate

desselben Serotyps eine Bindung zeigten, so z. B. der Serotyp M25, was auf eine kapselabhängige Bindung hindeutete. Durch eine Behandlung der Bakterien mit Hyaluronidase, was zur Degradation der Hyaluronsäurekapsel führt, mit anschließendem Bindungsversuch, konnte bestätigt werden, dass die Bindung kapselabhängig war (Daten nicht gezeigt).



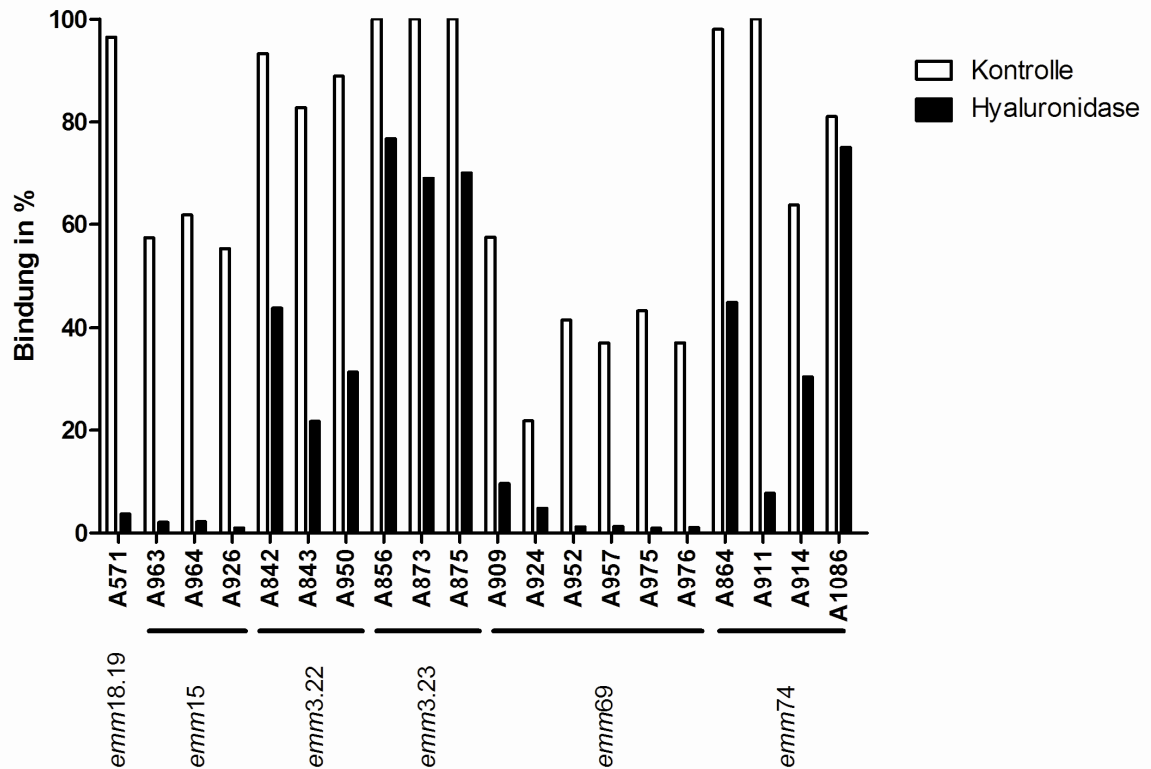
**Abbildung 3.3:**  $^{125}\text{I}$ -Kollagen IV-Bindung der südindischen Isolate. 11 Isolate zeigten eine hohe Bindung zwischen 100 – 70%. Eine intermediäre Bindung von 70 – 20% wurde bei 12 Isolaten ermittelt. 23 Isolate zeigten eine schwache Kollagen IV-Bindung (Bindungswerte zwischen 20 – 10%). Die verbleibenden 119 Isolate zeigten Bindungswerte <10%, wobei exemplarisch nur einige Isolate abgebildet sind. Das Isolat A570 (*emm3*) diente als Positivkontrolle.

Eine starke Bindung von 70 – 100% wurde bei allen Isolaten der Serotypen *emm3.22* und *emm3.23*, sowie des Serotyps *emm15* verzeichnet. Des Weiteren zeigten 80% der südindischen Isolate des Serotyps *emm74* eine starke Kollagen IV-Bindung. Eine intermediäre Bindung von 20 – 70% wurde bei dem Serotyp *emm69.1* festgestellt.

Bei 23 Isolaten konnte eine Bindung zwischen 10 - 20% detektiert werden und ließ eine kapselabhängige Bindung vermuten. Alle weiteren 119 Isolate zeigten Bindungswerte von weniger als 10% und wurden nicht abgebildet. In dieser Gruppe der Isolate befanden sich die drei indischen Isolate des Serotyps M18. Bei diesen konnte eine nur schwach ausgeprägte Hyaluronsäurekapsel beobachtet werden, was sich in den Bindungswerten widerspiegelte.

### 3.2.2 Charakterisierung der Kollagen IV-Bindung

Alle Isolate der Serotypen M3, M15, M69 und M74 zeigten eine Kollagenbindung von über 20%. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine proteinvermittelte bzw. kapselabhängige Bindung vorlag (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:**  $^{125}\text{I}$ -Kollagen IV-Bindung vor und nach Verdau der bakteriellen Kapsel mit Hyaluronidase. Bei den Isolaten der Serotypen *emm15* und *emm69* wurde nach dem Verdau der bakteriellen Kapsel mit Hyaluronidase keine Kollagen I- Bindung festgestellt. Die Bindung wurde somit über die Kapsel vermittelt. Die Isolate des Serotyps *emm3* zeigten nach Behandlung mit Hyaluronidase weiterhin eine Kollagen IV-Bindung, wobei diese leicht reduziert wurde. Die Kollagenbindung der Isolate des Serotyps *emm74* wurde ebenfalls reduziert. Als Kontrolle diente das Isolat A571 (*emm18*), bei dem nach Verdau der Kapsel keine Bindung festgestellt werden konnte.

Nach dem Verdau der bakteriellen Kapsel mit Hyaluronidase konnte die Kollagenbindung bei den Serotypen M15 und M69 auf unter 5% reduziert werden, was einer unspezifischen Bindung entsprach. Demnach lag hier eine kapselabhängige Bindung vor. Bei den Serotypen *emm3.22* und *emm3.23* konnte die Bindung nach dem Kapselverdau auf 30% bzw. 75% reduziert werden. Die Kollagenbindung des Kontrollisolats A571 mit dem Serotyp M18 wurde auf unter 5% reduziert.

Eine genauere Analyse des für die Kollagenbindung verantwortlichen Motives im M Protein zeigte, dass ein perfektes PARF Motiv in der Aminosäuresequenz des M3.23 Proteins vorlag.

Beim Serotyp *emm3.22* befand sich anstelle des Leucins an Position 57 der Aminosäuresequenz ein Phenylalanin. Es wurden demnach nicht die Kriterien zur Erfüllung eines PARF Motivs erfüllt (Abbildung 3.5), was die reduzierte Kollagenbindung nach dem Kapselverdau verdeutlichte.

#### (A/E/T)XYLZZLN

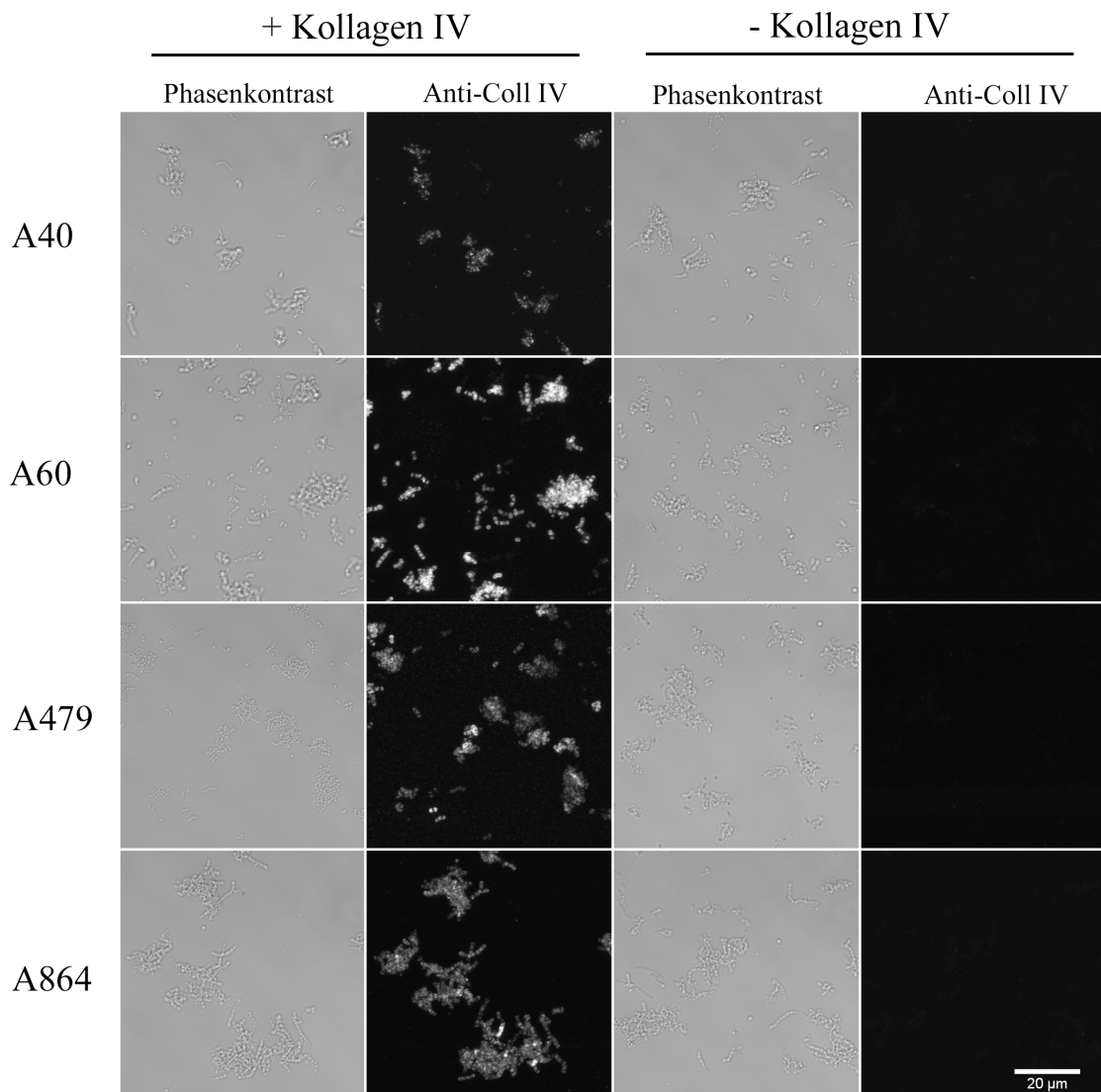
<i>emm3.1</i>	42	AQAGRLDLRQK <b>AEY<b>L</b>KGLN</b>	NDWAERLLQELN	71
<i>emm3.22</i>	40	AQAGRLDLRQK <b>AEY<b>L</b>K<b>G</b>F</b>	NDWAEKLLQELN	69
<i>emm3.23</i>	40	AQAGRLDLRQK <b>AEY<b>L</b>KGLN</b>	NDWAERLLQELN	69
Consensus		*****:	*	

**Abbildung 3.5: Alignment der PARF Region der Serotypen *emm3.22* und *emm3.23*.** Alignment der Region des PARF Motives sowie die flankierenden Aminosäuresequenzen verschiedener Subtypen des Serotyps M3. Die angegebene Nummerierung neben den Aminosäuresequenzen bezieht sich auf die Position im reifen M Protein. Die Aminosäuren des PARF Motives wurden fett dargestellt, „\*“ beschreibt identische Aminosäuren, „:“ gibt an, dass eine konservierte Substitution der Aminosäure vorliegt.

Des Weiteren wurde die Kollagenbindung von vier Isolaten des Serotyps *emm74* vor und nach Verdau der Hyaluronsäurekapsel untersucht. Wie oben erwähnt, zeigten diese Isolate eine Kollagenbindung von über 70%. Nach dem Verdau der bakteriellen Kapsel wurden Bindungswerte von 8 – 75% ermittelt. Bei dem Isolat A1086 wurde die Bindung nur geringfügig reduziert. Die Kollagenbindung des Isolats A911 wurde hingegen drastisch reduziert. Mit diesem Experiment wurde die Kapsel nicht eindeutig als Kollagenbindungsfaktor identifiziert.

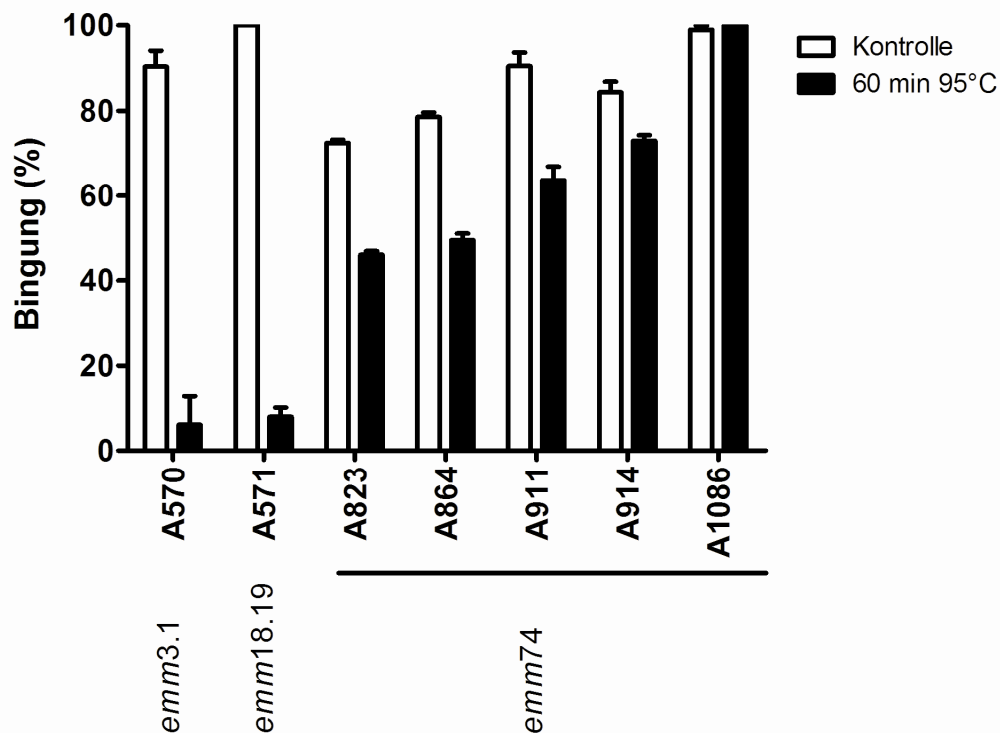
### 3.2.3 Charakterisierung der Kollagen IV-Bindung von Streptokokken des Serotyps M74

In Abbildung 3.6 sind mikroskopische Aufnahmen der Kollagen IV-Bindung in Abhängigkeit von Isolaten mit verschiedenen Serotypen dargestellt. Das Isolat A40 (Serotyp M12) zeigte keine Kollagen IV-Bindung. Eine Interaktion mit Kollagen IV auf der Bakterienoberfläche konnte hingegen bei den Isolaten der Serotypen M3 (A60 und A479) und M74 (A864) mit Hilfe eines anti-Kollagen IV Antikörpers und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers detektiert werden. Als Negativkontrollen dienten in PBS präinkubierte Bakterien.



**Abbildung 3.6: Mikroskopische Aufnahmen der Kollagen IV-Bindung von verschiedenen Streptokokkenisolaten.** Betrachtet wurden der nicht Kollagen IV Binder A40 (Serotyp M12) sowie die Kollagen IV Binder A60, A479 (Serotyp M3) und A864 (Serotyp M74) nach Präinkubation mit Kollagen IV bzw. PBS.

Eine Versuchsdurchführung, welche den Unterschied zwischen einer proteinvermittelten bzw. kapselabhängigen Bindung zeigen sollte, bestand darin, die Übernachtskulturen der Streptokokken bei 95°C zu inkubieren und anschließend einen radioaktiven Bindungsversuch durchzuführen. Es wurde erwartet, dass keine Bindung des M3 Isolates A570, aufgrund der Hitzedenaturierung der Proteine, mehr vorlag. Dies ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Obwohl die Kollagenbindung des M18 Isolates A571 kapselassoziiert und nicht proteinabhängig ist, konnte nach der Hitzedenaturierung keine Bindung mehr beobachtet werden. Die getesteten M74 Isolate hingegen zeigten nach der Hitzedenaturierung weiterhin eine Bindung von über 40%. Es wurde daher angenommen, dass die Kollagenbindung durch ein hitzestabiles Protein vermittelt wurde.



**Abbildung 3.7:**  $^{125}\text{I}$ -Kollagen IV-Bindung vor und nach Hitzedenaturierung. Zur Charakterisierung der Kollagen IV-Bindung wurden die Bakterien vor dem Bindungsexperiment für 60 min bei 95°C inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Bakterien. Es wurde keine Kollagenbindung bei den Isolaten A570 und A571, welche durch das M3 Protein, bzw. die Hyaluronsäurekapsel vermittelt wird, nach Hitzedenaturierung festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Isolate des Serotyps *emm74* weiterhin hohe Bindungswerte.

Bei Gruppe A Streptokokken sind bisher nur die Hyaluronsäurekapsel und das M3 Protein als Interaktionspartner mit Kollagen IV beschrieben. Da die bakterielle Kapsel nicht als Bindungsfaktor der Isolate des Serotyps *emm74* identifiziert werden konnte, wurde das rekombinante M74 Protein im *Dot Blot* mit radioaktiv markiertem Kollagen IV auf eine Bindung hin untersucht. Es wurde keine Bindung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die Analyse der Aminosäuresequenz des M74 Proteins. Es wurde kein PARF Motiv identifiziert. Die Interaktion mit Kollagen IV muss demnach durch ein unbekanntes, hitzestabiles Protein vermittelt werden.

Zusammenfassend war festzustellen, dass neben der M3 proteinvermittelten und kapselvermittelten Kollagen IV-Bindung zahlreicher Serotypen, die Isolate des Serotyps M74 eine nicht-kapselabhängige und nicht M Protein vermittelte Kollagen IV-Bindung zeigten. Diese Bindung wurde durch ein bisher unbekanntes, hitzestabiles Protein vermittelt. Es ist somit eine einzigartige Bindungseigenschaft im Vergleich zu M3 und M18 Isolaten festgestellt wurden, welche nach der Hitzedenaturierung keine Kollagen IV-Bindung zeigten.

### 3.3 Molekularepidemiologische Analyse der Streptokokken-isolate mittels Microarray

Durch die Verwendung des Microarrays war es möglich die Distribution zahlreicher Virulenzgene und putativer Faktoren zu untersuchen. Da der individuell angefertigte Array auf der Grundlage von drei vollständig sequenzierten Genomen basiert, konnten isolat- bzw. serotypspezifische Gene detektiert werden. In Verbindung mit der Isolationsquelle bzw. den ermittelten Serotypen der Isolate wurden die Daten gruppiert und miteinander verglichen.

#### 3.3.1 Allgemeine Distribution der Gene

Mit Hilfe eines zielgerichteten Gruppe A Streptokokken Virulenzgen-Microarray wurde das Genrepertoire von 201 indischen Isolaten untersucht. Es wurden 32 Haut-Isolate, 44 asymptomatische Rachenisolate, sowie 20 Pharyngitisisolate und 34 invasive Isolate untersucht (Tabelle 3.2). Von den verbleibenden Isolaten war die Quelle unbekannt.

**Tabelle 3.2: Isolationsquelle der für den Microarray verwendeten Streptokokkenisolate.**

	Rachen	Pharyngitis	Haut	Invasiv	unbekannt	gesamt
Nordindien	27	10	14	7	7	65
Südindien	17	10	18	27	64	136
<b>Gesamt</b>	<b>44</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>71</b>	<b>201</b>

91 Gene (41,55%), der insgesamt 219 betrachteten Gene, sind in allen Isolaten, unabhängig von Krankheitsstatus oder *emm*-Typ, zu finden. 150 Gene (68,5%) sind in > 80% der Isolate zu finden. Der Vergleich der nord- und südindischen Isolate zeigte, dass 102 Gene (46,6%) im Norden und 100 Gene (45,7%) im Süden in allen Isolaten zu finden waren. 145 Gene (66,2%) bzw. 153 Gene (69,9%) waren in über 80% der nordindischen bzw. südindischen Isolate präsent. Demnach gab es geringe Unterschiede im Genrepertoire der Isolate aus den beiden indischen Regionen (Tabelle 3.3).

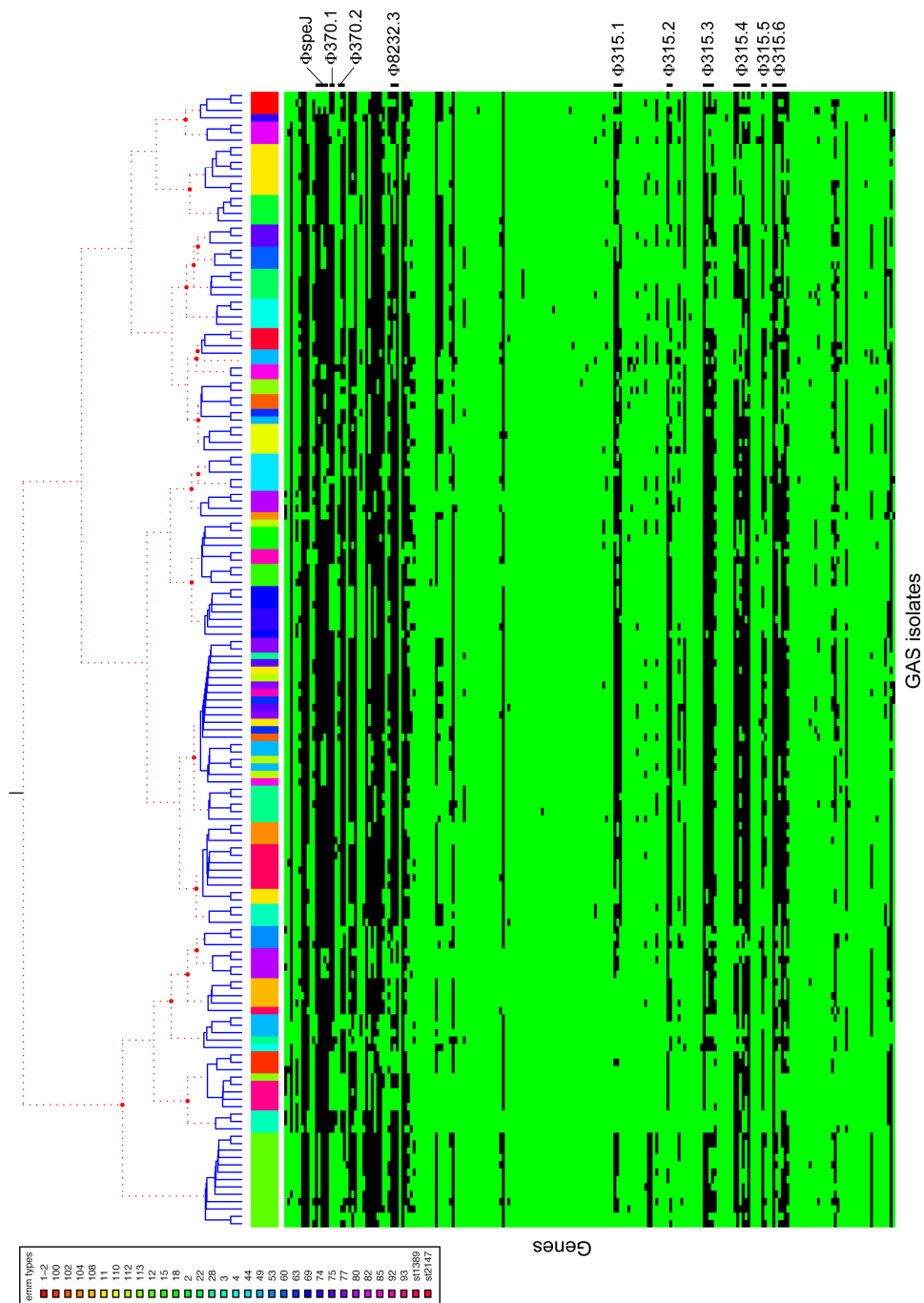
**Tabelle 3.3: Allgemeine Präsenz der Gene in Gruppe A Streptokokken.**

Präsenz in GAS	Anzahl (Prozent) der Gene		
	Indien	Nord	Süd
100%	91 (41,6%)	102 (46,6%)	100 (45,7%)
> 80 %	150 (68,5%)	145 (66,2%)	153 (69,9%)



### 3.3.2 Clusterdendrogramm

Auf Grundlage der allgemeinen Distributionsanalyse wurde ein Clusterdendrogramm erstellt (Abbildung 3.8). Durch den Vergleich von Isolaten verschiedener Serotypen wurde ein Kerngenom von 91 Genen identifiziert.



**Abbildung 3.8: Clusterdendrogramm von 201 Streptokokkenisolaten auf Grundlage des Genrepertoires.** Bei diesem hierarchischen Clustering wurden die Gene auf der x-Achse und die Isolate auf der y-Achse wiedergegeben. Farblich kodiert wurde der Serotyp dargestellt. Die Präsenz der Gene ist grün dargestellt. Die Abwesenheit der Gene ist durch schwarz wiedergegeben. Bakteriophagenassoziierte Gene zeigten die größte Variabilität in der Distribution.

Dies beinhaltet neben *housekeeping* Genen (Positivkontrollen des Microarray) auch Schlüsselvirulenzfaktoren, deren Funktionen kritisch für das Überleben des Pathogens sind. Zusätzlich zu diesem Kerngenom wurden bei jedem Isolat Gene detektiert, welche zu verschiedenen genotypischen und phänotypischen Charakteristika führten. Durch die ermittelten genotypischen Merkmale wurden verschiedene Clustergruppen identifiziert, welche mit den Serotypen übereinstimmten. Hierbei war zu erkennen, dass bakteriophagenassoziierte Gene den größten Einfluss auf die genotypische Diversität der Streptokokkenisolate haben. Die Gruppen der Adhäesine und Fibronektinbindungsproteine zeigten ebenfalls eine heterogene Verteilung.

#### 3.3.3 Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren

Als nächster Schritt wurden die Gene auf dem Array in die Gruppen „charakterisierte Virulenzfaktoren“ und „hypothetische Virulenzfaktoren“, welche durch bioinformatische Analysemodelle identifiziert wurden, unterteilt. Von den 63 charakterisierten Virulenzfaktoren, die analysiert wurden, sind 15 bakteriophagenassoziiert und 48 chromosomalkodiert (Tabelle 3.4). Die Daten zeigten, dass ca. 52% der chromosomalkodierten Faktoren ubiquitär präsent sind (in > 97% der Isolate) und die verbleibenden Faktoren mit einer Frequenz zwischen 1% bis 97% auftraten. Gene für extrazelluläre Proteasen und Hämolsine waren ubiquitär zu finden. Ausnahmen bildeten *sic* (*streptococcal inhibitor of complement-mediated lysis*) und *drs* (*distantly related sic*). *sic* war mit den Serotypen *emm1-2.2* und *emm57* assoziiert. Das Gen *drs* wurde nur bei den Serotypen *emm12* detektiert. Die Hämolsine Streptolysin O und Hämolysin III (SpyM3\_0815) waren zu je 84,08% präsent. Die Distribution der bakteriophagenassoziierten Faktoren reichte hingegen von 1,49% *mf4* (*mitogenic factor 4*) bis 30,85% Hyaluronidase (SpyM3\_1101).

Eine größere Heterogenität war in der Distribution von Adhäesinen und Fibronektinbindungsproteinen zu finden. So ist das *streptococcal fibronectin binding protein II* (*sof*) nur bei 14,43% der Isolate detektiert worden. Es zeigte sich keine serotypabhängige Verteilung. Das *fibronectin binding protein-like protein A* war hingegen in 95,02% der Isolate zu finden. Die unter der Gruppe „andere chromosomalkodierte Faktoren“ zusammengefassten Gene waren sehr homogen verteilt. Ausnahmen bildeten hier *grab* (*protein G-related alpha 2M-binding protein*), *amyA* (*cyclomaltodextrin glucanotransferase*), *dltD* (*secreted protein*) und *spa* (*streptococcal protective antigen*). Diese wurden bei 49,25%, 25,87%, 67,66% bzw. 19,40% der Isolate gefunden.

Das Gen *grab* war nur in wenigen Serotypen zu finden. Auffällig war, dass häufig in Indien auftretende Serotypen, wie *emm3.23*, *emm12*, *emm22*, *emm28*, *emm49.0*, *emm69* und *emm80* positiv sind. Die Subtyp *emm49.4* und *emm3.22* hingegen war negativ. Das

Gen *amyA* wurde vorrangig in den Serotypen *emm104*, *emm2*, *emm22*, *emm3*, *emm4*, *emm60*, *emm69* und *emm71* detektiert.

**Tabelle 3.4: Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken in Indien**

Virulenzfaktor	GeneID	Distribution (%)
<b>Adhäsine</b>		
R28	AF091393	97,51
Minor pili subunit	Spy_0130	1,00
putative collagen-like protein	SPy1054	99,00
collagen-like surface protein	SPy1983	100,00
putative collagen binding protein	SpyM18_0126	21,39
putative collagen binding protein cpa	SpyM3_0098	22,39
putative adhesion protein	SpyM3_0466	100,00
collagen-like protein SclB	SpyM3_0738	100,00
putative internalin A precursor	SpyM3_1035	99,50
putative collagen-like protein	SpyM3_1702	76,62
putative collagen-like protein	SpyM3_1703	33,33
laminin-binding protein	SpyM3_1725	97,51
<b>Fibronektinbindungsproteine</b>		
prtF15	AF009908	91,04
SfbX	AY120874	87,06
protein F2 like fibronectin-binding protein	SpyM3_0104	69,15
fibronectin-binding protein-like protein A	SpyM3_0652	95,02
PrtF2	U31980	72,64
SfbI	X67947	78,61
SfbII	X83303	14,43
<b>Proteasen</b>		
DRS	AJ300679	11,44
inhibitor of complement-mediated lysis	SPy2016	2,99
N-terminal fragment of Sib38 homologue	SpyM18_0921	100,00
putative C3-degrading proteinase	SpyM3_1598	100,00
streptokinase A precursor	SpyM3_1698	100,00
C5A peptidase precursor	SpyM3_1726	100,00
pyrogenic exotoxin B	SpyM3_1742	100,00
<b>Hämolysine</b>		
CAMP factor	SpyM3_0905	100,00
streptolysin O	SpyM3_0130	84,08
putative hemolysin	SpyM3_0276	100,00
streptolysin S associated protein	SpyM3_0480	100,00
putative hemolysin III	SpyM3_0815	84,08
putative hemolysin	SpyM3_1153	100,00

(Fortsetzung nächste Seite)

**Fortsetzung Tabelle 3.4: Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken in Indien**

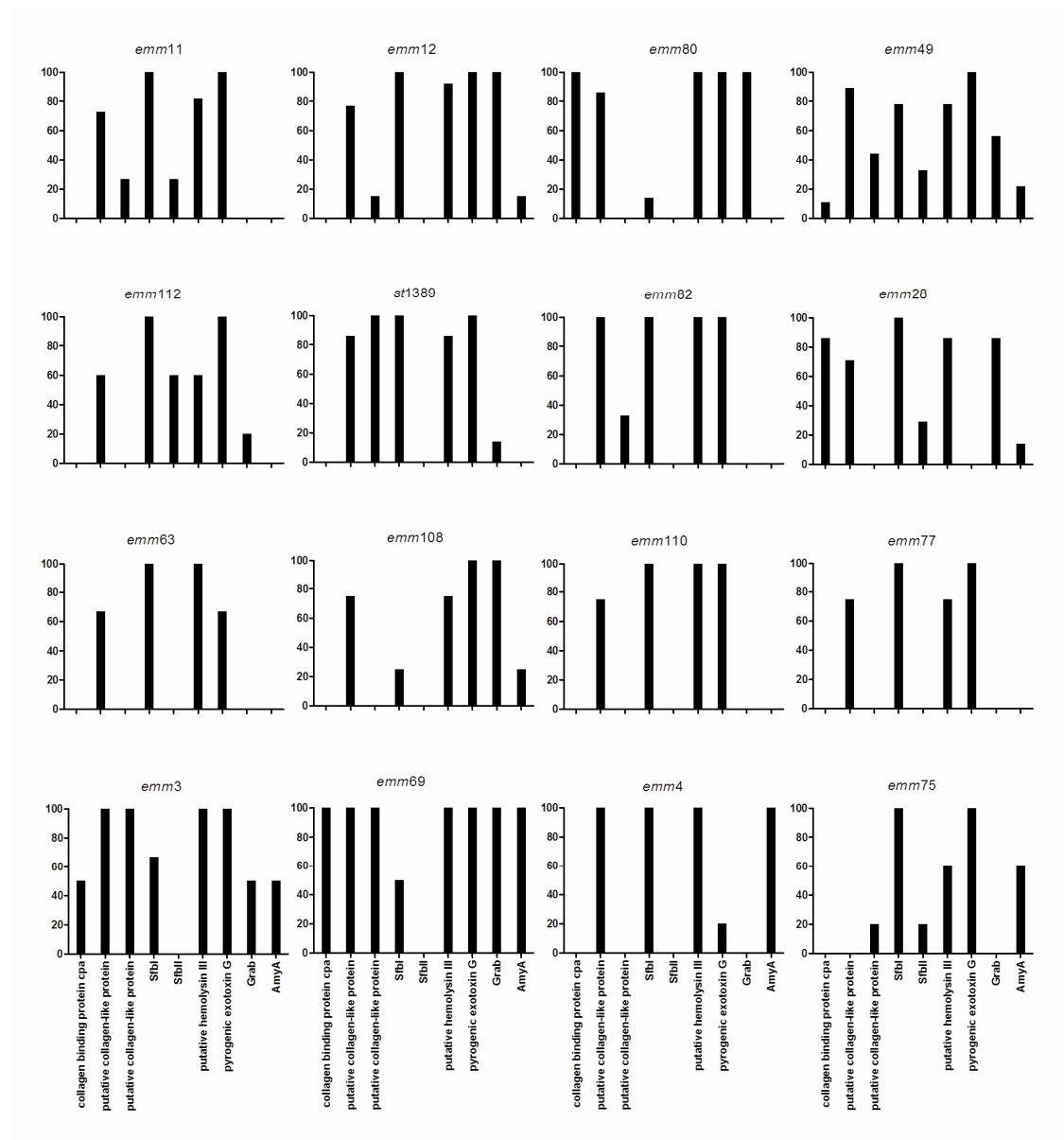
<b>Virulenzfaktor</b>	<b>GeneID</b>	<b>Distribution (%)</b>
<b>andere chromosomalkodierte Faktoren</b>		
mitogenic exotoxin Z	SPy1998	91,54
pyrogenic exotoxin G precursor	SpyM3_0155	90,05
lantibiotic salivaricin A precursor	SpyM3_1652	92,04
Myosin-crossreactive streptococcal antigen	SpyM3_0332	100,00
protein G-related alpha 2M-binding protein	SpyM3_1032	49,25
arginine deiminase	arcA	100,00
ndoS putative secreted endoglycosidase	SpyM3_1568	99,00
extracellular hyaluronate lyase	SpyM3_0665	100,00
putative hyaluronidase	SpyM3_1294	98,01
hyaluronan synthase hasA	SpyM3_1851	97,01
AmyA cyclomaltodextrin glucanotransferase	SPy1302	25,87
pullulanase pulA	SpyM3_1694	100,00
nicotine adenine dinucleotide glycohydrolase	SpyM3_0128	100,00
mitogenic factor 25K precursor	SpyM3_1745	100,00
secreted protein DltD	SpyM3_0991	67,66
streptococcal protective antigen	spyM18_2046	19,40
<b>bakteriophagenkodierte Faktoren</b>		
putative DNase	SPy0712	28,86
mitogenic factor (mf4)	SpyM3_1095	1,49
exotoxin speC	SPy0711	27,36
exotoxin SpeI	SPy1007	20,90
exotoxin SpeH	SPy1008	16,92
streptococcal superantigen SSA	SpyM3_0920	24,88
exotoxin SpeK	SpyM3_1205	24,88
exotoxin SpeA	SpyM3_1301	17,91
exotoxin SpeJ	SPy0436	21,89
exotoxin SpeL	SpyM18_1238	15,42
exotoxin SpeM	SpyM18_1239	27,86
hyaluronidase - phage associated	SpyM3_1101	30,85
hyaluronidase - phage associated	SpyM3_1214	24,38
streptococcal phospholipase A2	SpyM3_1204	21,39
deoxyribonuclease mf3	SPy1436	11,44

Zusammenfassend war festzustellen, dass ca. 50% der chromosomalkodierten Faktoren bei allen Isolaten zu finden waren. Gene für extrazelluläre Proteasen und Hämolyse waren ubiquitär zu finden. Ausnahmen bildeten hier *sic* und *drs*. Im Gegensatz dazu war eine heterogene Verteilung der bakteriophagenassoziierten Faktoren zu verzeichnen. Auf diese soll später näher eingegangen werden. Bei einzelnen chromosomalkodierten Faktoren wurde eine serotypspezifische Distribution festgestellt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die 16 am häufigsten in Indien auftretenden Serotypen näher betrachtet.

### 3.3.4 Serotypabhängige Distribution von charakterisierten Virulenzfaktoren

Im Folgenden wurde die Distribution ausgewählter Virulenzfaktoren der 16 am häufigsten in Indien auftretenden Serotypen näher betrachtet. Im Anhang (Tabelle 6.2) sind alle charakterisierten Faktoren aufgelistet. In Abbildung 3.9 wurden neun Virulenzfaktoren dargestellt, welche einen deutlichen Unterschied in der serotypabhängigen Verteilung der Gene zeigten.

Wie oben schon erwähnt, wurde das Gen *grab* bei den Serotypen *emm12*, *emm28*, *emm69*, *emm80* und *emm108* detektiert. Bei den Serotypen *emm3* und *emm49* wurden nur 50% bzw. 56% der jeweiligen Isolate positiv für die Präsenz des Gens getestet. Es wurde eine subtypspezifische Restriktion der Verteilung beobachtet.



**Abbildung 3.9: Serotypabhängige Distribution ausgewählter Virulenzfaktoren.** Dargestellt ist die Distribution der Faktoren der 16 häufigsten in Indien auftretenden Serotypen. Es ist eine serotypspezifische Distribution einzelner chromosomalkodierter Faktoren zu erkennen.

Die Subtypen *emm3.23* und *emm49.0* wiesen das Gen auf, die Subtypen *emm3.23* und *emm49.4* hingegen nicht. Das Gen *cpa* war lediglich bei vier Serotypen zu finden. Alle Isolate der Serotypen *emm69* und *emm80* wurden positiv getestet. Des Weiteren war es in ca. 80% der Isolate des Serotyps *emm28* präsent. Bei dem Serotyp *emm3* war eine subtypspezifische Distribution zu erkennen. Der Subtyp *emm3.23* besaß das Gen, *emm3.22* hingegen nicht. Das chromosomalkodierte Superantigen *speG* wurde bei fast allen Serotypen zu 100% detektiert. Im Gegensatz dazu kam es bei nur 67% der *emm63*, zu 20% der *emm4* und keinem der *emm28* Isolate vor.

Die Verteilungen der Gene *sfbI* und *sfbII*, sowie der Gene für *putative collagen-like proteins* (SpyM3\_1702 und SpyM3\_1703) waren sehr heterogen. *sfbI* ist mit Ausnahme von den Serotypen *emm3*, *emm69*, *emm108*, *emm80* und *emm49* zu 100% konserviert.

In Übereinstimmung mit einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung, wurde beobachtet, dass Isolate des Serotyps *emm12* durch das Fehlen des Gens *citE* charakterisiert sind (Vlaminckx, 2007). Das Citratlyaseoperon ermöglicht die Adaptation an metabolische Stressbedingungen wie niedriger pH, Akkumulation von Laktat (Martin, 2004) und hypoxische Bedingungen (Srinivasan, 2006).

Es konnte somit eine serotypspezifische Distribution einzelner chromosomalkodierter Faktoren beobachtet werden. Bei einigen Serotypen lag eine subtypspezifische Restriktion in der Verteilung der Gene vor.

#### 3.3.5 Vergleich der Gendistribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten

In mehreren Publikationen der letzten Jahre wurde postuliert, dass der Anstieg invasiver Erkrankungen durch eine veränderte genetische Ausstattung ausgelöst wird (Musser, 1995; Aziz, 2005; Sumby, 2005). Daher wurde im Folgenden die Gendistribution von 34 invasiven Isolaten mit 167 nicht-invasiven Isolaten verglichen (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5: Vergleich der allgemeine Präsenz der Gene in Gruppe A Streptokokken zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten.**

Präsenz in GAS	Anzahl (Prozent) der Gene	
	invasive Isolate	nicht-invasive Isolate
100 %	119 (54,3%)	104 (47,5%)
> 80 %	163 (74,4%)	159 (72,6%)

119 Gene (54,3%) waren bei allen invasiven Isolaten zu finden. Bei den nicht-invasiven Isolaten waren 104 Gene (47,5%) in allen Isolaten präsent. 163 Gene (74,4%) bzw. 159 Gene (72,6%) wurden bei über 80% der invasiven bzw. nicht-invasiven Isolaten detektiert. Hier zeigten sich erwartungsgemäß keine größeren Unterschiede. Im

Folgenden sollten einige ausgewählte Faktoren näher betrachtet werden. Die Unterschiede in der Verteilung dieser Faktoren zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Bei den Adhäsinen bzw. Fibronectinbindungsproteinen zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den betrachteten Gruppen an Isolaten. Ausnahmen bildeten hier die Gene *cpa* (*collagen binding protein*, SpyM3\_0098) und *sfbII* (*sof, serum opacity factor*), welche bei den invasiven Isolaten häufiger zu finden waren.

Das Gene *spa* (*streptococcal protective antigen*) aus der Gruppe der chromosomalkodierten Faktoren zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,005$ ) in der Verteilung zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten. Es war ca. 5mal so häufig in den Isolaten zu finden, welche invasive Erkrankungen hervorrufen. Das Gen für die Streptodornase *mf3* kam ca. 10mal so häufig in invasiven Isolaten ( $p < 0,005$ ) vor.

Des Weiteren wurden vier Gene, welche hypothetische Proteine kodieren, identifiziert, welche signifikant häufiger bei invasiven Isolaten detektiert wurden: SpyM18\_0480, SpyM18\_0477, Spy0430 und SpyM3\_0701 ( $p < 0,005$ ).

Die Gene SpyM18\_0480 und SpyM18\_0477 kodieren sekretierte Proteine, d.h. es wurde ein Signalpeptid vorhergesagt. Datenbankanalysen ergaben jedoch keine Homologien, des Weiteren konnten keine putativen konservierten Domänen identifiziert werden. Diese Gene wurden mit nur 4,2% bzw. 0,6% bei nicht-invasiven Isolaten detektiert. Bei den invasiven Isolaten hingegen waren diese Faktoren in einem Drittel bzw. einem Fünftel präsent.

Das Gen Spy0430 kodiert ein nicht charakterisiertes Protein mit Signalpeptidsequenz. Es wurde mit 23,5% etwa 6mal so häufig bei invasiven Isolaten detektiert. Das Gen SpyM3\_0701 kodiert ein phagenassoziiertes putatives *immunity repressor protein* und wurde 2,5mal so häufig bei invasiven Isolaten detektiert.

**Tabelle 3.6: Vergleich der Distribution von ausgewählten Genen zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten.**

Virulenzfaktor	GeneID	Distribution (%)	
		invasiv	nicht-invasiv
Adhäsine			
collagen binding protein cpa	SpyM3_0098	32,35	20,36
putative collagen-like protein	SpyM3_1702	85,29	74,85
Fibronektinbindungsproteine			
PrtF2	U31980	85,29	70,06
SfbII	X83303	23,53	12,57
andere chromosomalkodierte Faktoren			
hyaluronan synthase <i>hasA</i>	SpyM3_1851	88,24	98,80 *
cyclomaltodextrin	SPy1302	35,29	23,95
glucanotransferase <i>amyA</i>			
streptococcal protective antigen	SpyM18_2046	58,82	11,38 *
streptococcal superantigen SSA	SpyM3_0920	35,29	22,75
protein G-related alpha 2M-bindingprotein	SpyM3_1032	58,82	47,31
mitogenic exotoxin Z	Spy1998	82,35	93,41
bakteriophagenkodierte Faktoren			
hyaluronidase	SpyM3_1214	35,29	22,16
Deoxyribonuclease mf3	SPy1436	44,12	4,79 *
nicht charakterisierte Faktoren (Distribution <95%)			
phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	SpyM3_0862	88,24	72,46
putative periplasmic-iron-binding protein	SpyM3_0747	88,24	100,00 *
hypothetical protein	SpyM3_1830	58,82	70,66
hypothetical protein	SpyM18_2055	67,65	50,90
hypothetical protein	SpyM3_0131	32,35	21,56
hypothetical protein	SpyM3_0132	91,18	99,40 *
hypothetical protein	SpyM18_0480	38,24	4,19 *
hypothetical protein	SpyM18_0477	23,53	0,60 *
hypothetical protein	Spy0430	23,53	4,19 *
hypothetical protein	SpyM18_1050	76,47	62,28
hypothetical protein	SpyM3_0014	76,47	89,22
hypothetical phage protein	SpyM18_0753	47,06	33,53
hypothetical phage protein	SpyM3_0701	38,24	14,97 *
hypothetical phage protein	SpyM3_0702	70,59	37,72
hypothetical phage protein	SpyM3_1210	79,41	58,68
hypothetical phage protein	SpyM3_1256	44,12	34,13
hypothetical phage protein	SpyM3_1265	20,59	8,98
hypothetical phage protein	SpyM3_1324	85,29	73,65

\* p&lt;0,05



### 3.4 Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokken

Wie in Kapitel „3.3.2 Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren“ gezeigt wurde, weisen die phagenassoziierten Faktoren eine heterogene Verteilung auf. Eine Gruppe dieser Faktoren sind die Superantigene. Diese pyrogenen Exotoxine sind potente Immunstimulatoren, assoziiert mit rheumatischem Fieber, Scharlach und toxischem Schock (Cunningham, 2000; Smoot, 2002). Mit Ausnahme von *speG* und *smeZ* sind die Superantigene bakteriophagenassoziiert. Es wird angenommen, dass Phagen zur genetischen Variabilität bei Gruppe A Streptokokken beitragen (Banks, 2002; Beres, 2002).

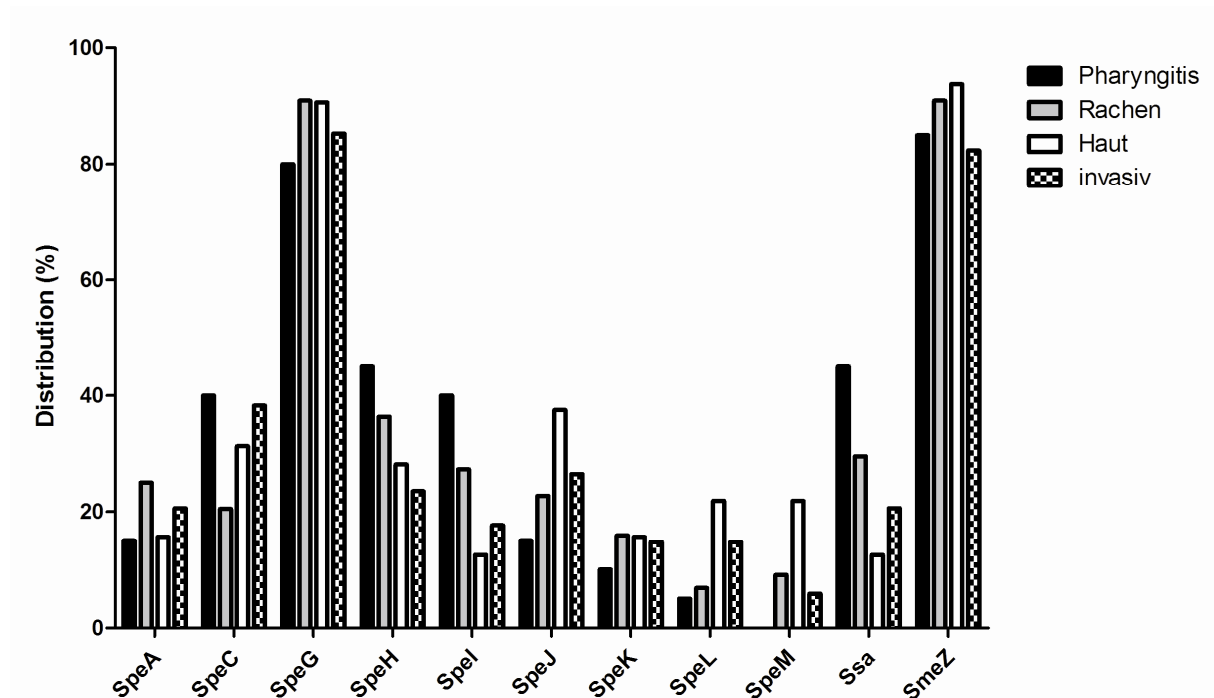
Um einen Einblick in die aktuelle epidemiologische Situation (Zeitraum: 2007 – 2010) in Indien zu erhalten, wurde daher die Verteilung der phagenassoziierten und chromosomalkodierten Superantigene untersucht. Dies ist die erste in diesem Umfang durchgeführte Analyse der Distribution von Superantigenen indischer Streptokokkenisolate. Die Präsenz der Superantigene wurde mittels PCR überprüft. Damit diene diese Methode des Weiteren zur Validierung der erhaltenen Microarray-Resultate.

#### 3.4.1 Allgemeine Distribution von Superantigenen

Gruppe A Streptokokken besitzen chromosomal- und bakteriophagenkodierte Superantigene. Die chromosomalkodierten Faktoren *SpeG* und *SmeZ* waren in mehr als 80% aller Isolate zu finden (Abbildung 3.10). Dies steht im Kontrast zu vorherigen PCR basierten Studien, welche diese Faktoren in 100% der Isolate gefunden haben (Proft, 2000 und 2003). Isolate, bei denen die Superantigene *SpeG* und *SmeZ* nicht detektiert wurden beschränken sich auf wenige Serotypen. Als *SpeG*-negative Serotypen wurden *emm28* (7 Isolate), *emm4.2* (4), *emm60.7* (3), *emm109.1* (2) und *st11014* (2) bestimmt. Die Serotypen *emm2* (3), *emm44* (5) und *emm49.0* (5) sind *SmeZ*-negativ. Der Serotyp *emm49.4* hingegen war *SmeZ*-positiv (4). Das Gen *speJ* kam bei 26,87% der Isolate vor. Bei den Serotypen *emm80* (7), *emm44* (5), *emm112* (5) *emm60* (4), *emm110* (4), *emm1-2.2* (3), *emm85* (3), *emm105* (2), *emm25* (2) und *emm56* (2) wurde das Gen in allen Isolaten des jeweiligen Serotyps detektiert. Bei den folgen Serotypen wurde das *speJ* Gen nur in einem Teil der Isolate detektiert: *emm108* (1/4), *emm22.8* (1/4), *emm75* (3/5) und *emm49.4* (3/4).

Die Gene *speA* und *speC*, welche mit invasiven Erkrankungen assoziiert werden (Imöhl, 2010; Wahl, 2007), wurden bei 19,4% bzw. 29,85% der Isolate detektiert. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Gene bei invasiven und nicht-invasiven Isolaten. Das Gen *ssa* wurde bei zahlreichen Serotypen detektiert (z.B. *emm12*, *emm22.8*, *emm60*, *emm85*, *emm3.23*, *st1732* und *st2147*). Auffällig war, das

der Serotyp *emm3.23* *ssa*-positiv war, der Serotyp *emm3.22* jedoch nicht. Die Superantigene SpeK, SpeL und SpeM werden mit akutem rheumatischem Fieber assoziiert (Proft 2003, Smoot LM 2002). Die entsprechenden Gene wurden bei 12,94%, 15,92% bzw. 12,44% der Isolate detektiert.



**Abbildung 3.10: Distribution der Superantigene bei indischen Gruppe A Streptokokken.** Es wurde die prozentuale Häufigkeit von 11 Superantigenen in Abhängigkeit von der Isolationsquelle dargestellt. Die chromosomalkodierten Faktoren *speG* und *smeZ* wurden bei über 80% der Isolate detektiert.

Das Gen *speK* wurde bei allen Isolaten der Serotypen *emm4* (5 Isolate), *emm2* (4), *st2147* (3), *stD432* (2), *emm56* (2), *emm9* (2), *emm103* (1) und *emm122* (1) amplifiziert. Bei den folgen Serotypen wurde das *speK* Gen nur in einem Teil der Isolate detektiert: *emm85* (3/4), *emm80* (2/7) und *emm108* (1/4). Bei den drei indischen Isolaten des Serotyps *emm18* wurde das Gen nicht nachgewiesen.

Im Gegensatz zur Studie von Smoot (Smoot LM 2002), welcher die Gene *speL/M* ausschließlich in Streptokokken des Serotyps M18 nachwies, wurden hier zahlreiche Serotypen gefunden, welche beide Gene besitzen können (z.B. *emm100*, *emm108*, *emm57* und *emm93*). 13 Isolate wiesen nur das Gen *speL* auf, wobei 8/11 Isolate des Serotyps *emm11* zu dieser Gruppe zählten, die verbleibenden drei Isolate waren negativ für die Genkombination *speL/M*. Sechs Isolate wiesen lediglich das Gen *speM* auf. Die drei isolierten indischen M18 Streptokokken wurden hingegen negativ für die Kombination *speL/M* getestet. Lediglich ein Isolat wies das Gen *speL* auf.

### 3.4.2 Superantigenprofile von Gruppe A Streptokokken

Es wurden bei den 201 untersuchten Isolaten 63 verschiedene Genprofile detektiert. Jedes dieser Genprofile ist einzigartig in der Kombination der Superantigene. Die Profile 1 – 5 repräsentierten etwa ein Drittel der gesamten Isolate. Die unten aufgeführten 11 häufigsten Genprofile (Tabelle 3.7) erfassten 53% der gesamten Isolate. Die Diversität an Genprofilen der restlichen 94 Isolate war mit 52 distinkten Profilen sehr groß. 39 Profile wurden durch weniger als 3 Isolate pro Profil vertreten, wobei unter diesen auch häufig auftretende Serotypen vorkamen (*emm49*, *emm11*, *emm44*) und somit keine Abhängigkeit zwischen Serotyp und Genprofil beobachtet werden konnte. Die Anzahl der Gene pro Profil lag zwischen einem und neun Genen, mit einem Mittelwert von 4 Genen pro Profil.

Genprofil 1, welches nur durch die Präsenz der chromosomalkodierten Faktoren *speG* und *smeZ* charakterisiert ist, trat mit 11,94% am häufigsten auf. Genprofil 2 zeichnet sich durch das zusätzliche Vorhandensein von *speJ* aus und wurde durch 7,96% der gesamten Isolate vertreten. Genprofil 3 ist durch die Präsenz der chromosomalkodierten Faktoren und dem Vorhandensein von *speA* bestimmt und trat bei 4,98% der Isolate auf. Die Genprofile 4 und 5 wurden mit je 4,48% detektiert. Die Genprofile 1 - 3 besaßen 2 bzw. 3 Gene, das Genprofil 4 hingegen ist durch die Präsenz von 6 Faktoren bestimmt.

**Tabelle 3.7: Superantigenprofile der indischen Gruppe A Streptokokken.** In der Tabelle sind die 11 häufigsten Superantigenprofile dargestellt. Insgesamt ließen sich 63 verschiedene Profile bei 201 Isolaten bestimmen.

Genprofil	Anzahl Isolate	% Isolate	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Anzahl Gene
1	24	11,94	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
2	16	7,96	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3
3	10	4,98	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3
4	9	4,48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	6
5	9	4,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
6	8	3,98	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	4
7	7	3,48	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	4
8	6	2,99	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	5
9	6	2,99	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3
10	6	2,99	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3
11	6	2,99	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	4

Das Genprofil 5 weist lediglich das Gen *smeZ* auf. Alle Isolate (7) des häufig auftretenden Serotyps *emm28* wurden in diesem Profil gefunden, wobei drei der Isolate mit einer invasiven Erkrankung assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass 50% der invasiven Isolate die Genprofile 1 - 11 besaßen, wobei 20,6% die Genprofile 1 und 2 repräsentieren. Somit zeichneten sich diese nur durch die Faktoren *speG*, *speJ* und *smeZ* aus. Betrachtet man alle invasiven Isolate, so besaßen diese im Schnitt 3,5

Superantigene. Die Isolate aus dem Rachen (asymptotisch) besaßen im Durchschnitt 3,75, Pharyngitisisolate 3,8 und Isolate der Haut 3,81 Faktoren. Somit ließ sich kein Zusammenhang zwischen Anzahl der Superantigene und Isolationsquelle feststellen.

30,0% der bekannten Pharyngitis verursachenden Isolate waren in den oben dargestellten häufigsten 11 Genprofilen zu finden. 61,4% der Rachenisolate besaßen eines der oben aufgeführten Profile, wobei 20,5% das Genprofil 1 besaßen. Die Hautisolate waren mit 50,5% in den 11 am häufigsten auftretenden Genprofilen vertreten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die chromosomalkodierten Faktoren wenig zur Diversität an Superantigenprofilen beitragen. Die große Kombinationsmöglichkeit an phagenassoziierten Genen ist der entscheidende Faktor, welcher zur Beobachtung von 63 verschiedenen Superantigenprofilen führte.

#### **3.4.3 Vergleich der Diversität der Superantigenprofile in Abhängigkeit vom Serotyp**

Wie gezeigt werden konnte, ist die Diversität an Superantigenprofilen in Indien sehr groß. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den Superantigenprofilen und den Serotypen gibt. In Tabelle 3.8 ist das Vorkommen von Genprofilen in Abhängigkeit vom Serotyp dargestellt. Man erkennt, dass es mitunter eine große Diversität an Genprofilen innerhalb eines Serotyps gab. Einigen Serotypen hingegen lässt sich jedoch nur ein Genprofil zuordnen, so z.B. den Serotypen *emm77* und *emm110*. Die 5 untersuchten Isolate des Serotyps *emm77* zeigten alle das Superantigenprofil 1, d.h. Isolate dieses Serotyps besitzen keine bekannten phagenassoziierten Exotoxine. Dem Serotyp *emm110* konnte ausschließlich das Genprofil 11 zugewiesen werden. Die Serotypen *emm11* und *emm49* hingegen zeigten 5 bzw. 6 verschiedene Profile. Bei Serotyp *emm11* besaßen 55% der untersuchten Isolate das Genprofil 7. Die anderen Genprofile wurden nur bei jeweils 1 – 2 Isolaten detektiert. Bei Serotyp *emm49* hingegen konnte kein dominantes Superantigenprofil festgestellt werden. Die 6 verschiedenen Genprofile wurden durch nur jeweils 1 – 2 Isolate vertreten. Es wurden bei den Subtypen *emm49.0* und *emm49.4* jeweils drei distinkte Genprofile verzeichnet. Bei Gruppe A Streptokokken des Serotyps M3 wurde zwei Genprofile festgestellt, wobei die Subtypen *emm3.22* und *emm3.23* je eines der Profile präsentierten.

**Tabelle 3.8: Anordnungsbeziehung zwischen *emm*-Typ und Superantigenprofil**

<i>emm</i> Typ	Gen- profil	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Anzahl Isolate
12.0	18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	2
	4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	9
12.40	8	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	2
11.0	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	7	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6
	49	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	1
	52	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1
49.0	26	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	2
	31	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	2
	35	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	1
49.4	2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	2
	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	1
	21	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	1
28.0	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4
28.5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
80.0	2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3
	20	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	2
	21	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	2
st1389.1	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	5
	56	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1
st1389.2	14	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	1
3.22	3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3
3.23	15	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3
112.2	2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	5
77.0	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	4
82.1	8	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	3
108.0	14	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	2
	46	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	1
	50	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1
110.0	11	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	4

Bei den oben dargestellten Serotypen wurden 1 – 6 verschiedene Superantigenprofile je Serotyp verzeichnet. Die große Diversität an Superantigenprofilen in Indien konnte nicht allein durch die hohe Anzahl an verschiedenen Serotypen erklärt werden, da verschiedene Serotypen das gleiche Superantigenprofil aufweisen konnten. So besaßen z. B. 13 verschiedene Serotypen das Genprofil 1. Im Gegensatz dazu besaßen alle 9 Isolate mit dem Profil 4 den Serotyp *emm*12. Ein Grund für die hohe Diversität an Genprofilen ist der Fakt, dass ein Serotyp bis zu 6 verschiedene Genprofile zeigen konnte.

### 3.4.4 Co-Detektion von Superantigenen

Um bestimmen zu können, ob eine nicht randomisierte Assoziation zwischen verschiedenen Toxingenen vorlag (verursacht durch Co-Lokalisation oder *emm*-Typ Restriktion) wurde eine paarweise statistische Analyse vorgenommen und die beobachteten Kombinationsereignisse mit den mathematisch ermittelten Wahrscheinlichkeiten (Berechnet durch die Division der miteinander multiplizierten beobachteten Distributionsraten in Prozent und der Gesamtsumme in Prozent) verglichen. Eine Gegenüberstellung dieser Werte ergab, dass einige Genkombinationen häufiger auftraten als die erwarteten Werte vermuten ließen (Tabelle 3.9). Zum Beispiel wurden die Gene *speH* bei 28,86% und *speI* bei 20,90% der Isolate detektiert. Die beobachtete Co-Detektion lag bei 20,90%. Im Vergleich zur ermittelten Wahrscheinlichkeit von 6,03% war die beobachtete Co-Detektion signifikant höher ( $p < 0,005$ ). Die Isolate der Serotypen *emm110* und *emm44* wiesen nur das Gen *speH* auf. Dies steht im Kontrast zu der dokumentierten Präsenz auf demselben Bakteriophagen ( $\Phi 370.2$ ) (Ferretti, 2001), bestätigt aber Ergebnisse vorheriger Studien (Proft, 2003, Ekelund, 2005).

**Tabelle 3.9: Co-Detektionsraten von Superantigenen bei Gruppe A Streptokokken**  
(erwartete /beobachtete Co-Detektion in Prozent)

	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>
<i>speA</i>	-									
<i>speC</i>	6/5	-								
<i>speG</i>	17/16	27/30	-							
<i>speH</i>	6/5	9/10	26/27	-						
<i>speI</i>	4/5	6/9	19/19	6/21*	-					
<i>speJ</i>	5/3	8/2	24/25	8/10	6/4	-				
<i>speK</i>	3/2	4/3	12/10	4/4	3/3	3/4	-			
<i>speL</i>	3/1	7/5	14/15	5/3	3/3	4/3	2/0	-		
<i>speM</i>	2/1	4/4	11/12	4/4	3/4	3/2	2/0	2/9	-	
<i>ssa</i>	5/3	7/6	21/21	7/9	5/7	6/7	3/5	4/1	3/1	-
<i>smeZ</i>	18/18	27/26	82/82	26/25	29/19	25/24	12/11	15/14	11/12	21/23

\*  $p < 0,005$

Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurden *speL* und *speM* nicht immer co-detektiert (Commons, 2008; Proft, 2003, Igwe, 2003). Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da die beiden Gene in benachbarter Position auf demselben Bakteriophagen ( $\Phi speL/M$ ) liegen sollten (Smoot, 2002). Es wurde keine signifikante Abhängigkeit beobachtet.

In Tabelle 3.10 ist eine Übersicht der Co-Detektion von Superantigenen in Abhängigkeit von der Isolationsquelle dargestellt. Wie zu erwarten war, waren die Co-Detektionsraten der chromosomalkodierten Faktoren (*speG*, *smeZ*) hoch. Die beobachteten Frequenzen der Co-Detektionen für die übrigen Faktoren entsprachen den berechneten Wahrscheinlichkeiten, d.h. es lag eine unabhängige Verteilung der Faktoren vor. Ausnahmen bilden, wie oben schon beschrieben, die Kombination *speH/I*,

deren Co-Detektionen signifikant höher als die erwarteten Frequenzen der jeweiligen Gruppe an Isolaten war.

**Tabelle 3.10: Übersicht der Co-Detektion der Superantigene in Abhängigkeit von der Isolationsquelle.** In dieser Übersicht wurde die Co-Detektion der einzelnen Superantigene neben der prozentualen Häufigkeit farblich kodiert wiedergegeben. I, invasive Isolate; H, Hautisolate; R, Rachenisolate; P, Pharyngitisisolate

	<i>speA</i>				<i>speC</i>				<i>speG</i>				<i>speH</i>				<i>speI</i>			
	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P
<i>speA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speC</i>	5,88	6,25	4,55	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speG</i>	17,65	15,63	18,18	5,00	38,24	31,25	20,45	40,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speH</i>	8,82	0,00	11,36	5,00	8,82	12,50	9,09	25,00	23,53	28,13	29,55	40,00	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speI</i>	8,82	0,00	11,36	5,00	5,88	9,38	9,09	25,00	17,65	12,50	20,45	35,00	17,65	12,50	27,27	40,00	-	-	-	-
<i>speJ</i>	2,94	3,13	6,82	0,00	5,88	3,13	0,00	0,00	26,47	37,50	22,73	15,00	11,76	15,63	13,64	5,00	5,88	3,13	4,55	5,00
<i>speK</i>	0,00	0,00	9,09	5,00	2,94	0,00	6,82	5,00	11,76	15,63	9,09	5,00	2,94	6,25	6,82	5,00	0,00	3,13	6,82	5,00
<i>speL</i>	2,94	0,00	0,00	0,00	5,88	12,50	0,00	5,00	14,71	18,75	6,82	5,00	5,88	3,13	2,27	0,00	5,88	3,13	2,27	0,00
<i>speM</i>	2,94	3,13	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	0,00	5,88	18,75	9,09	0,00	5,88	3,13	4,55	0,00	5,88	3,13	4,55	0,00
<i>ssa</i>	2,94	0,00	6,82	0,00	11,76	0,00	9,09	15,00	17,65	12,50	29,55	45,00	8,82	3,13	15,91	30,00	5,88	0,00	15,91	25,00
<i>smeZ</i>	14,71	15,63	25,00	10,00	32,35	28,13	15,91	30,00	64,71	84,38	81,82	70,00	11,76	21,88	34,09	45,00	8,82	12,50	27,27	40,00

	<i>speJ</i>				<i>speK</i>				<i>speL</i>				<i>speM</i>				<i>ssa</i>			
	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P	I	H	R	P
<i>speA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speH</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speJ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speK</i>	5,88	9,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speL</i>	2,94	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>speM</i>	2,94	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,88	15,63	6,82	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ssa</i>	5,88	3,13	6,82	10,00	5,88	6,25	2,27	0,00	2,94	0,00	2,27	0,00	2,94	0,00	2,27	0,00	-	-	-	-
<i>smeZ</i>	23,53	31,25	20,45	15,00	14,71	15,63	11,36	5,00	8,82	21,88	6,82	0,00	2,94	21,88	9,09	0,00	20,59	12,50	27,27	45,00

Weitere Ausnahmen wurden bei den Hautisolaten und Pharyngitis verursachenden Isolaten festgestellt. Im Gegensatz zu den beobachteten Co-Detektionen von *speA/C* (0%), *speA/ssa* (0%) und *speC/J* (0%) wurden bei den Pharyngitisisolaten signifikant größere erwartete Co-Detektionsraten ermittelt (*speA/C* 6%, *speA/ssa* 7%, *speC/J* 6%;  $p < 0,03$ ). Es wurde somit eine negative Beeinflussung dieser Faktoren festgestellt. Bei Isolaten der Haut hingegen war die beobachtete Co-Detektion der Faktoren *speL/M* mit 16% signifikant größer als die erwartete Co-Detektion von 5% ( $p < 0,02$ ).

Vergleicht man nun die beobachteten Co-Detektionen in Abhängigkeit von der Isolationsquelle miteinander, wurden bestimmte Genkombinationen bei Pharyngitisisolaten signifikant häufiger als bei Hautisolaten gefunden. Es wurde die Kombination *speH/I* bei 40,0% der Pharyngitisisolate festgestellt. Im Gegensatz dazu kam diese nur bei 12,5% der Hautisolate vor ( $p < 0,05$ ). Die Kombinationsrate von *speH/ssa* war bei Pharyngitisisolaten mit 30,0% höher als bei Hautisolaten (3,1%;  $p = 0,001$ ). Des Weiteren kam die Kombination *speG/ssa* bei Pharyngitisisolaten mit 45,0% häufiger als bei Hautisolaten (12,5%;  $p < 0,02$ ) vor.

Die Kombination *speI/ssa* wurde bei Hautisolaten nicht detektiert, bei invasiven Isolaten mit 5,88%. Im Gegensatz dazu konnte dieses Kombinationsereignis bei 25,0% der Pharyngitis verursachenden Isolate beobachtet werden. Die Kombination *speI/smeZ*

trat ebenfalls häufiger bei Pharyngitisisolaten als bei Isolaten der Haut bzw. invasiven Erkrankungen auf ( $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend war festzustellen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten bezüglich der Distribution einzelner Exotoxingene gab. Es wurden jedoch, im Gegensatz zu vorherigen Studien, einige *speG*- und *smeZ*-negative Serotypen identifiziert. Des Weiteren wurden subtypspezifische Distributionen einzelner Gene beobachtet. Die in dieser Studie untersuchten Isolate des Serotyps M18 wurden negativ für das Vorhandensein der mit akutem rheumatischem Fieber assoziierten Faktoren *speL/M* und *speK* getestet. Bei der Betrachtung der Co-Detektion der Superantigene wurde eine nicht randomisierte Assoziation der Gene *speH/I* beobachtet. Eine signifikante Abhängigkeit der Faktoren *speL/M* wurde nur bei Isolaten der Haut festgestellt. Die Kombinationsereignisse *speA/C*, *speA/ssa* und *speC/J* bei den Pharyngitisisolaten schienen sich negativ zu beeinflussen, da die erwarteten Co-Detektionsraten signifikant höher als die beobachteten Werte waren. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede der Co-Detektionsraten der Superantigene in Abhängigkeit von der Isolationsquelle festgestellt.



### 3.4.5 Prophagen in Gruppe A Streptokokken

Es wurde gezeigt, dass eine große Diversität an Superantigenprofilen bei den indischen Streptokokkenisolaten vorlag. Im Folgenden wurden die Isolate mit den Superantigenprofilen 1, 2 und 6 näher betrachtet. Diese zeichneten sich durch das Vorhandensein der chromosomalkodierten Faktoren *speB*, *speG*, *smeZ* und *speJ* aus. Es wurden keine bakteriophagenkodierenden Superantigene detektiert. Neben pyrogenen Superantigenen können auch andere nicht-pyrogene Faktoren, wie DNasen, die Phospholipase A (SlaA), MefA (*macrolide efflux A*) und das Protein R6, bakteriophagenkodiert sein. Die phagenkodierten Faktoren R6 und MefA wurden ausschließlich bei Streptokokken des Serotyps *emm6* beschrieben (Banks, 2003 & 2004).

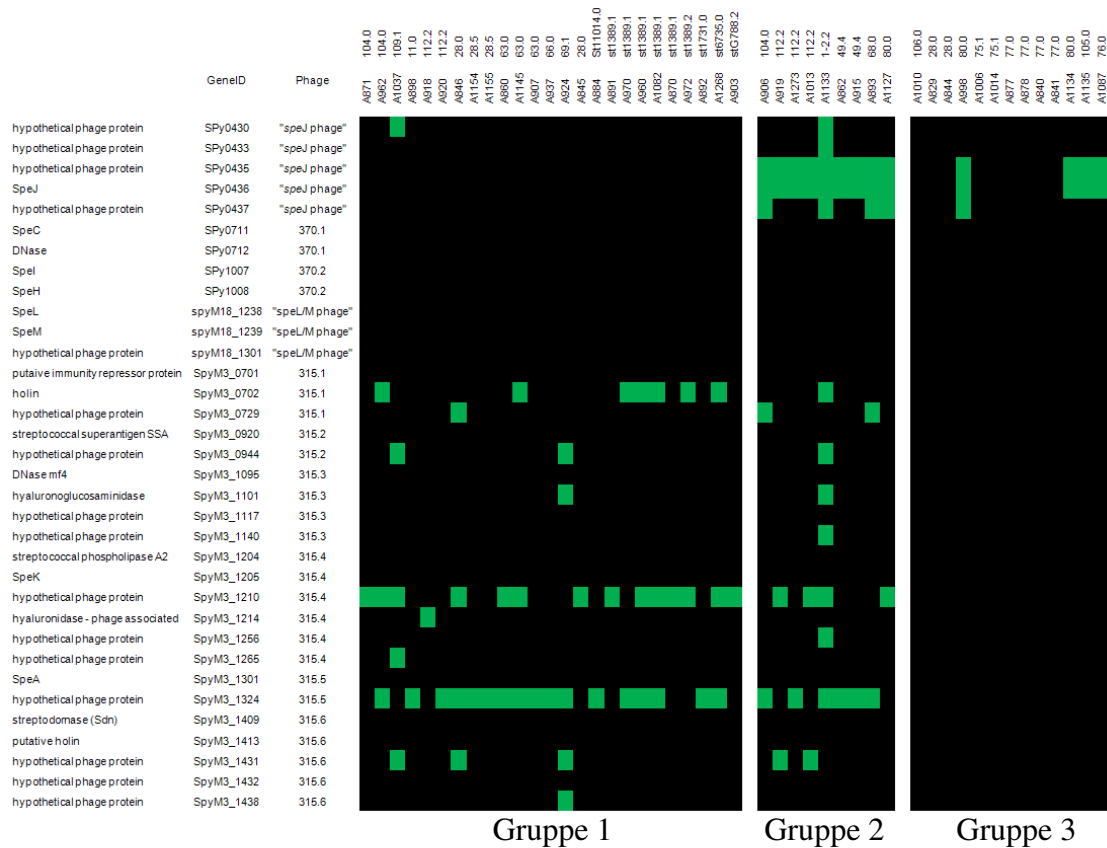
Mit dem Array war es möglich, die DNasen und SlaA zu detektieren. Darüber hinaus ist es möglich, mit dem Microarray zahlreiche Gene für hypothetische Phagenproteine, wie Holine und phagenassoziierte Hyaluronidasen, nachzuweisen. Es wurde festgestellt, dass zahlreiche Isolate phagenassoziierte Gene tragen, jedoch keine der oben genannten Virulenzfaktoren.

In Abbildung 3.11 sind alle Isolate aufgeführt, die keinen bakteriophagenkodierenden Virulenzfaktor aufwiesen. Diese konnten in drei Gruppen eingeteilt werden: Gruppe 1 zeichnete sich durch das Vorhandensein von zahlreichen hypothetischen Phagenproteinen aus (n=25) und war *speJ* negativ. Die Isolate der Gruppe 2 (n=9) waren positiv für das Gen *speJ* sowie zahlreiche hypothetischen Phagenproteine. Gruppe 3 wies keine hypothetischen Phagenproteinen auf (n=13), konnte aber durch das Vorhandensein von *speJ* und *speJ*-assoziierten Genen charakterisiert sein. Demnach besaßen 6,5% der indischen Isolate keinen bekannten Bakteriophagen.

Bei Gruppe 2 wurden die Gene SpyM3\_1210 und SpyM3\_1324, welche hypothetische Phagenproteine kodieren, häufig detektiert. Diese Gene wurden ebenfalls bei Gruppe 1 mit 53% bzw. 63% detektiert. Das Gen SpyM3\_0702, welches ein putatives Holin kodiert, wurde bei ca. einem Drittel der Isolate aus Gruppe 1 detektiert und ist mit dem Phagen Φ315.1 assoziiert. Von diesem ist bekannt, dass er keinen charakterisierten Virulenzfaktor kodiert. Auffällig war jedoch, dass die drei den Phagen repräsentierenden Gene nie alle gemeinsam detektiert wurden. Andere hypothetische Phagenproteine wurden bei 1 – 6 Streptokokkenisolaten detektiert.

Betrachtet man Gruppe 2 und 3, welche durch das Gen *speJ* charakterisiert sind, stellt man fest, dass nur das Isolat A1133 (*emm1.2-2*) positiv für die *speJ*-assoziierten Gene ist. Die übrigen Isolate zeigten die Präsenz von nur 2 – 3 *speJ*-assoziierten Genen. Es konnte somit nicht der Genlocus des „SpeJ-Bakteriophagen“ des M1 Isolates SF370 detektiert werden (Ferretti, 2001). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Sequenzen der bakteriophagenkodierten Gene nicht konserviert sind bzw. es einen Unterschied im strukturellen Aufbau der Phagen gibt.

Die Daten indizieren somit das Vorhandensein unbekannter Bakteriophagen, welche bisher nicht beschrieben wurden.



**Abbildung 3.11: Präsenz von prophagenassoziierten Genen in Gruppe A Streptokokken.** In der Abbildung sind alle Isolate aufgeführt, die keinen bakteriophagenkodierenden Virulenzfaktor aufwiesen. Gruppe 3 wies des Weiteren keine bakteriophagenassoziierten Gene auf. Bei den Gruppen 2 und 3 hingegen wurden phagenassoziierte Gene detektiert (Präsenz der Gene in grün dargestellt, Absenz schwarz).

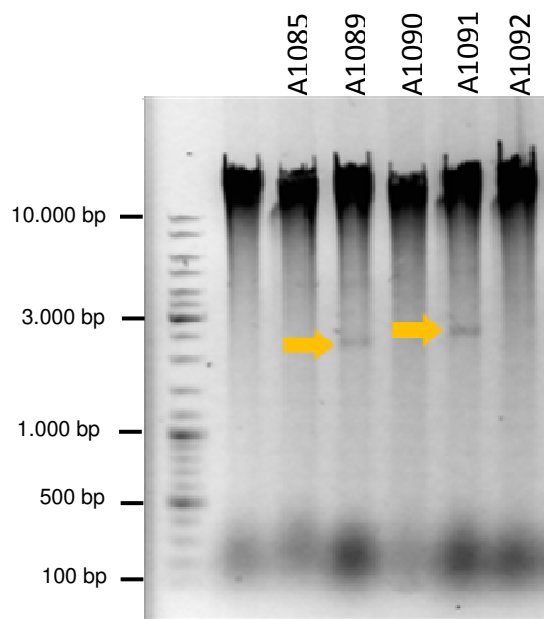
### 3.5 Natürlich vorkommende Plasmide in Gruppe A Streptokokken

Bei der Spezies *Streptococcus pyogenes* wurden bisher drei kleine Plasmide mit einer Größe bis 5 Kilobasen und drei größere Plasmide mit einer Größe von ca. 19 bis 29 Kilobasen entdeckt. Man unterscheidet diese auf Grundlage der enthaltenen Gene. Bei Streptokokken der pyogenen Gruppe wurden Resistenzplasmide entdeckt, welche durch die Gene *ermA*, *ermB* (Cegłowski, 1994) bzw. *ermT* (Woodbury, 2008) eine Resistenz gegen Macrolide, Lincosamide und Streptogramin B zeigen. Des Weiteren wurden zwei plasmidkodierte Bakteriocine identifiziert. Dies sind antibiotisch wirksame Proteine, die eng verwandte Arten oder sogar andere Stämme der gleichen Art hemmen oder abtöten. Das Bakteriocin SA-M57 wurde bei Streptokokken des Serotyps M57 gefunden. Über das Vorkommen von Dysgalacticin liegen keine Daten vor.

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war die Epidemiologie der Plasmide von Gruppe A Streptokokken. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Serotyp und der Präsenz von Plasmiden gefunden. Des Weiteren wurden zwei bisher unbekannte Plasmide entdeckt und sequenziert.

### 3.5.1 Serotypspezifisches Vorkommen von Plasmiden

In Folge eines in der vorliegenden Arbeit verbesserten DNA Präparationsprotokolls wurden in zahlreichen Isolaten Plasmide im Agarosegel detektiert. Es zeigte sich eine serotypspezifische Abhängigkeit des Vorhandenseins der Plasmide, wobei diese unterschiedliche Größen im Gel aufwiesen. Bei den Isolaten A1089 und A1091 mit den Serotypen *emm85.0* und *emm22.8* waren neben den hochmolekularen Banden der genomischen DNA je eine weitere Bande bei 2,2 kb bzw. 2,5 kb zu erkennen (Abbildung 3.12). Des Weiteren wurden bei den Serotypen *emm11.0*, *emm53.0*, *emm68.0*, *emm69.1*, *emm82.1* und *emm111.1* Plasmide im Agarosegel detektiert.



**Abbildung 3.12: Agarosegel der DNA Präparation von Gruppe A Streptokokken.** Die genomische DNA ist als hochmolekulare Bande zu erkennen. Bei zwei der abgebildeten Isolate waren DNA Banden bei 2,2 kb und 2,5 kb zu erkennen. Die Isolate besaßen die Serotypen *emm85.0* und *emm22.8*.

Als klassische Methode der Charakterisierung von Plasmiden wurde zunächst eine Restriktionsanalyse vorgenommen. Es wurden vier verschiedene Restriktionsprofile beobachtet, was auf das Vorhandensein von verschiedenen Plasmiden hindeutete (Tabelle 3.11). Durch die Klonierung eines Plasmidfragments (Serotyp *emm111.1*) in den Vektor pCR2.1 und anschließender Sequenzierung wurde das Gen *dysA*, welches das Bakteriocin Dysgalactacin kodiert, identifiziert. Das Plasmid hatte das Restriktionsprofil 3. Der Serotyp *emm82.1* wies ebenfalls dieses Profil auf. Restriktionsprofil 4 wurde bei Isolaten des Serotyps *emm69.1* und *emm85.0* gefunden. Die Restriktionsprofile 3 und 4 unterscheiden sich durch die Anzahl der erhaltenen Banden im Gel nach dem Verdau mit *HindIII*. Bei dem Serotyp *emm22.8* wurde Profil 2 gefunden. Die Serotypen *emm11.0*, *emm53.0* und *emm68.0* wurden dem Restriktionsprofil 1 zugewiesen.

**Tabelle 3.11: Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide der Gruppe A Streptokokken.** Es wurden 4 verschiedene Restriktionsprofile erhalten. Profil 3 und 4 unterscheiden sich durch die Anzahl der erhaltenen Banden nach Verdau mit *HindIII*.

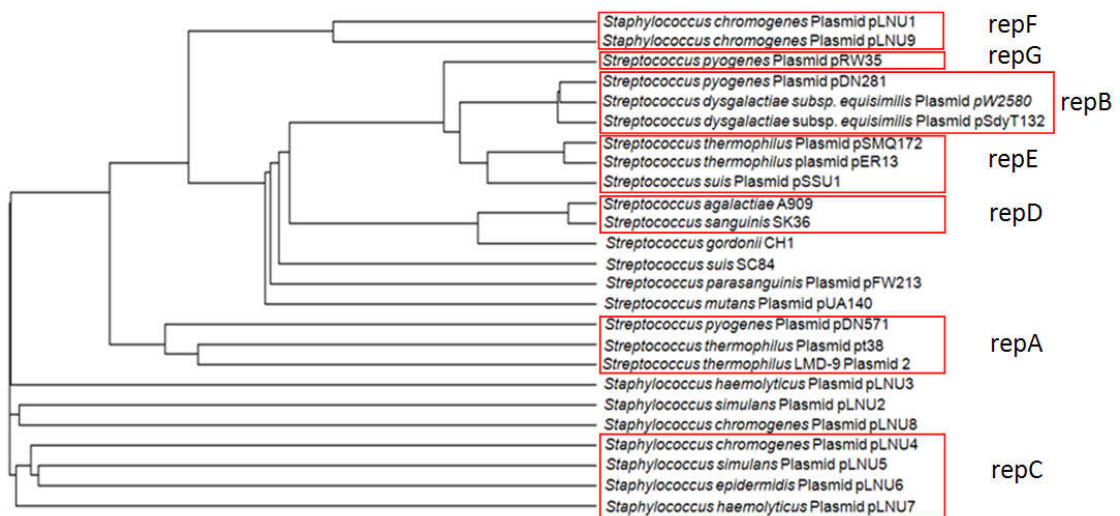
	<i>HindIII</i>	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>emm</i> Typ
Profil 1	-	+	-	-	11.0; 53.0, 68.0
Profil 2	+	-	-	+	22.8
Profil 3	+	+	+	-	111.1, 82.1
Profil 4	+	+	+	-	69.1; 85.0

### 3.5.2 PCR basierte Detektion von Genen für Replikations-initiationsproteine

Durch die Restriktionsanalyse wurden vier verschiedene Profile gefunden. Profil 3 konnte das Gen *dysA* zugewiesen werden. Das weitere Vorgehen wurde durch *screening* PCRs bestimmt. Es wurde gezeigt, dass das Gen *dysA* mit dem Gen *repB* (*replication initiation protein B*) assoziiert ist (GenBank: AY995189; Heng, 2006) bzw. sich die Gene für Streptococcin A-M57 und *repA* (*replication initiation protein A*) auf demselben Plasmid befinden (Heng, 2004). Um diese genauer zu charakterisieren wurden 279 indische Isolate auf das Vorhandensein der Gene *repA*, *repB*, *dysA* und *sa-M57* mittels PCR getestet.

Durch die PCR Analyse wurde festgestellt, dass 11 Isolate das Gen *repB* tragen. Alle diese Isolate wurden ebenfalls positiv für *dysA* getestet (100% co-Detektion). Diese zeigten das Restriktionsprofil 3. Im Gegensatz dazu wurden die Gene Streptococcin A-M57 und *repA* in nur 40,9% (n=9) der Isolate co-detektiert. Diese Isolate ließen sich, wie oben beschrieben, ebenfalls dem Restriktionsprofil 3 zuordnen. Demnach wurden 13 Isolate (59,1%) positiv für *repA* getestet, jedoch negativ für das Vorhandensein des Gens Streptococcin A-M57. Diese Isolate besaßen das Restriktionsprofil 2. Die Serotypen *emm11.0*, *emm53.0* und *emm68.0*, welche das Restriktionsprofil 1 aufwiesen, zeigten keine Amplifikate für die Gene *repA* und *repB*, noch für *dysA* und Streptococcin A-M57.

Da es nicht möglich war, Amplifikate der Plasmide des Restriktionsprofils 1 zu erzeugen oder verdaute Plasmidfragmente zu klonieren, wurden die Gene für Replikationsinitiationsproteine der Spezies *Streptococcus* und *Staphylococcus* verglichen. Es wurden 25 *rep* Gene aligniert und ein Dendrogramm erstellt (siehe Abbildung 3.13). Auf dieser Grundlage konnten fünf Primerpaare in konservierten Bereichen der jeweiligen Gruppe erstellt werden.

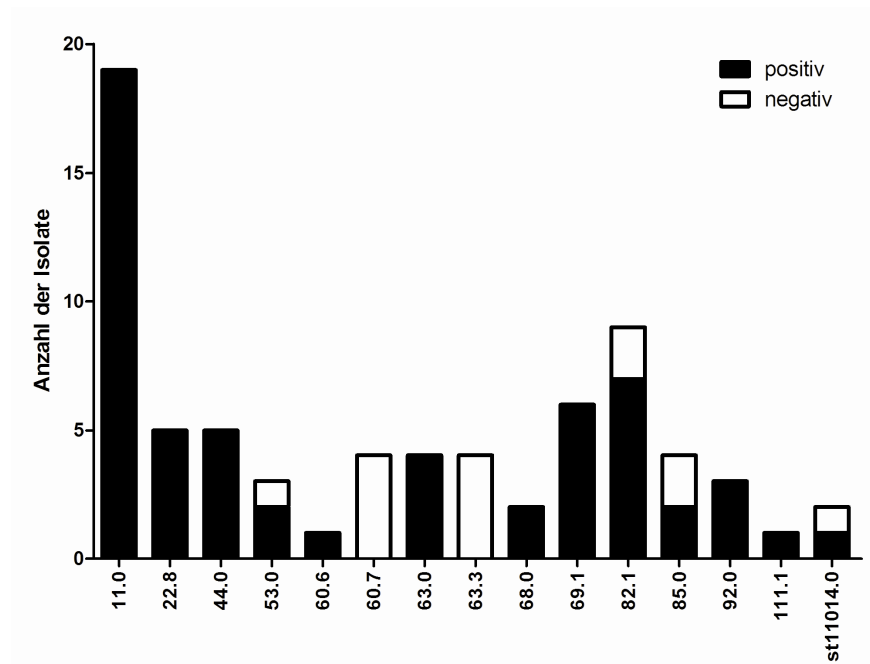


**Abbildung 3.13: Dendrogramm der Gene für Replikationsinitiationsproteine der Spezies *Streptococcus* und *Staphylococcus*.** Die bisher bekannten Gene für Replikationsproteine der Spezies *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Plasmide < 5 kb) ließen sich mit den Primerpaaren repA und repB amplifizieren. Ausnahme bildete hier das Gen für das Replikationsprotein des Plasmids pRW35. Hierfür wurde das Primerpaar repG entwickelt. Auf Grundlage des Sequenzalignments konnten 3 weitere Primerpaare entworfen werden (repC – repE).

Mit dem Primerpaar repE wurden zwei Amplifikationsprodukte erhalten. Dies ermöglichte eine Sequenzierung und die Amplifikation der Plasmide. Das sequenzierte Replikationsgen wurde als *repB* bezeichnet, da es 79,7% Homologie zum *repB* Gen des Plasmides pSdyT132 aufwies. Das Gen *repB* wurde bei 26 Isolaten (9,32%) nachgewiesen.

### 3.5.3 Epidemiologie natürlich vorkommender Plasmide in Gruppe A Streptokokken

Auf Grundlage der oben beschriebenen PCR Analysen wurde folgende Übersicht (Abbildung 3.14) der Epidemiologie natürlich vorkommender Plasmide in Gruppe A Streptokokken angefertigt. Es wurde gezeigt, dass 13 Serotypen (16,88% von 77 Serotypen) ein Plasmid tragen können, d.h. aber nicht, dass alle Isolate eines Serotyps ein Plasmid besaßen. So wurden bei sieben Isolaten des Serotyps *emm82.1* ein Plasmid detektiert, bei zwei Isolaten hingegen nicht. Es wurden weiterhin Restriktionen hinsichtlich des Subtyps beobachtet. Der Serotyp *emm63.0* ist durch das Vorhandensein eines Plasmides charakterisiert, der Subtyp *emm63.3* hingegen wies kein Plasmid auf.



**Abbildung 3.14: Distribution natürlich vorkommender Plasmide bei indischen Gruppe A Streptokokken.** Es wurden Plasmide bei 13 verschiedenen Serotypen detektiert. Bei Serotyp *emm11*, welcher der am häufigsten in Indien isolierte Serotyp war, konnte in allen Isolaten ein Plasmid nachgewiesen werden. Es wurden Restriktionen hinsichtlich des Subtyps beobachtet. Der Serotyp *emm63.0* ist durch das Vorhandensein eines Plasmides charakterisiert, der Subtyp *emm63.3* hingegen wies kein Plasmid auf.

Das Gen *dysA* wurde bei den Serotypen *emm111.1*, *emm60.6*, *emm82.1* und *st11014* detektiert. Das Gen Streptococcin A-M57 wurde bei den Serotypen *emm69.1* und *emm85.0* amplifiziert. Im Gegensatz zu vorherigen Studien (Heng, 2004) wurde das Gen jedoch nicht bei den drei indischen Isolaten des Serotyps *emm57* amplifiziert. Die Serotypen *emm22.8*, *emm44.0* und *emm92.0* waren positiv für das Gen *repA*, jedoch negativ für Streptococcin A-M57. Das Gen *repB* wurde bei den Serotypen *emm11.0*, *emm53.0*, *emm63.0* und *emm68.0* amplifiziert.

Auf diese Weise wurden somit potentiell neue Plasmide in den Serotypen *emm22.8*, *emm44.0*, *emm92.0* und *emm11.0*, *emm53.0*, *emm63.0*, *emm68.0* identifiziert, die im Folgenden genauer untersucht werden sollten.

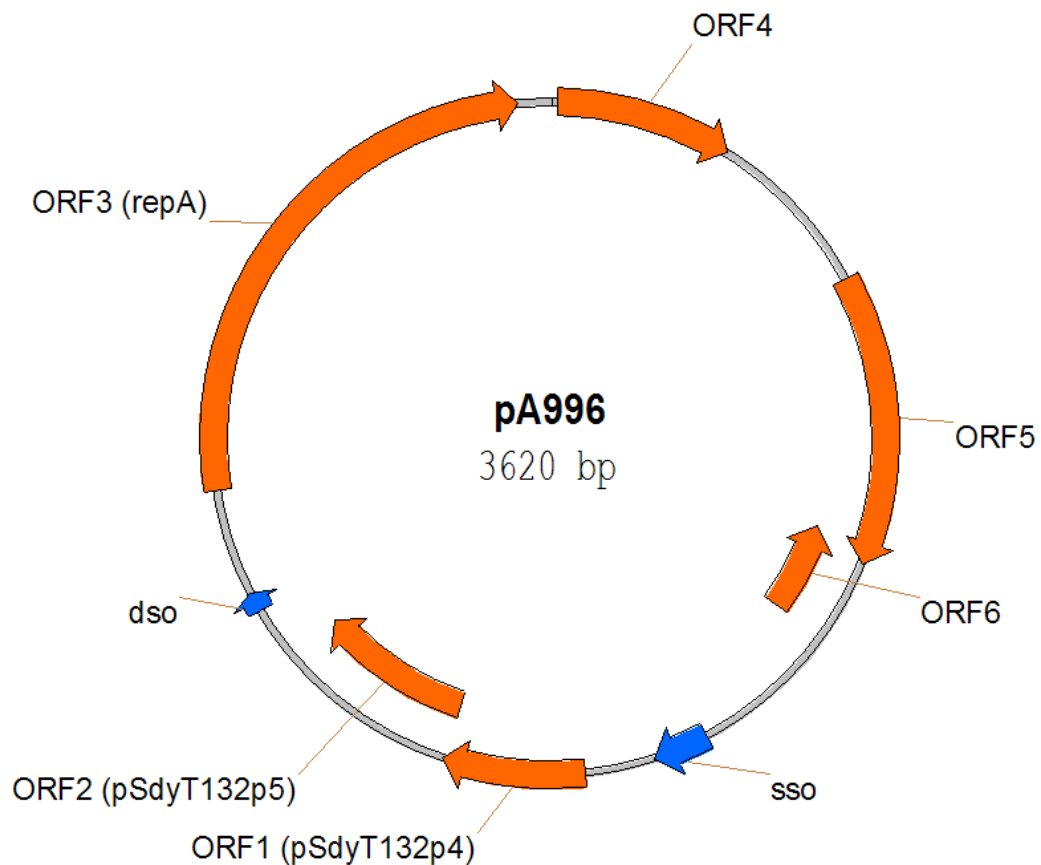
### 3.5.4 Sequenzierung der bisher unbekannten Plasmide

Die zwei neuen Plasmide wurden mit Hilfe der Abteilung Genomanalyse des HZI vollständig sequenziert, um Informationen über neue potentielle Bakteriocine bzw. Virulenzfaktoren zu erhalten. Die Plasmidkarten sind in den Abbildungen 3.15 und 3.18 dargestellt (Sequenzen der Plasmide sind im Anhang zu finden.)

#### 3.5.4.1 *Streptococcus pyogenes* Plasmid pA996

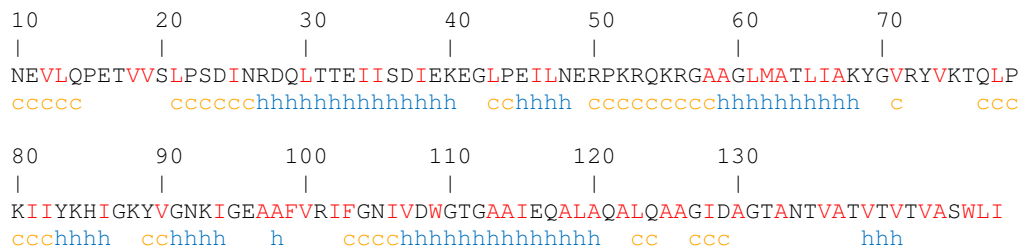
Das Plasmid pA996 des Isolates A996 (*emm44.0*) hat eine Größe von 3620 bp und einen GC Gehalt von 31,88%. Der GC Gehalt war damit niedriger als der für das M1 Genom beschriebene Gehalt von 38,5% (Ferretti, 2001). Es wurden 6 *open reading frames* (ORF) identifiziert, die Polypeptide >50 Aminosäuren kodieren (Abbildung 3.15). ORF1 und ORF2 stimmten zu 98% bzw. 97% mit ORFs des Plasmids pSdyT132 aus *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* überein. Diese kodieren die hypothetischen Proteine pSdyT132p4 und pSdyT132p5. Die Aminosäuresequenzen stimmten zu 100% bzw. 97% überein. ORF3 kodiert ein 313 Aminosäuren großes Protein, welches 83% Homologie zu dem Replikationsinitiationsprotein RepA des Plasmids pDN571 aus *Streptococcus pyogenes* (Heng, 2004) bzw. 79-81% Homologie zu Replikationsinitiationsproteinen von *Streptococcus thermophilus* (Somkuti, 1998; O'Sullivan, 1999) zeigte. Diese Plasmide gehören zu der pC194/pUB110 Familie der *rolling-circle* Plasmide und repräsentieren die zahlenmäßig am stärksten vertretene Gruppe an Plasmiden mit einer sehr hohen Diversität (Seery, 1993). Aufgrund der putativen Funktion von ORF3 wurde dieser als *repA* bezeichnet. Plasmide, welche nach dem *rolling-circle* Mechanismus replizieren, weisen drei essentielle genetische Elemente auf: ein Gen welches das Replikationsinitiationsprotein (Rep) kodiert, und den *double-strand* (DSO) und *single-strand* (SSO) Replikationsursprung. Wie erwartet, zeigte das Plasmid pA996 einen DSO der pC194/pUB110 Familie. Der SSO zeigte 89% Homologie zum SSO der *Streptococcus thermophilus* Plasmide LMD-9 Plasmid 2 (Makarova, 2006), Plasmid pER35 und pER16 (Solow, 2000). Für den ORF4 wurden keine Homologien gefunden. Bei der Analyse der N-terminalen Region des Proteins mit dem Programm SignalP (Bendtsen, 2004) konnte kein Signalpeptid identifiziert werden.





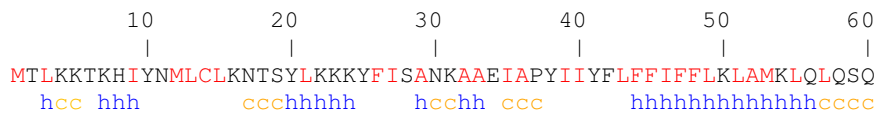
**Abbildung 3.15: Vektorkarte des Gruppe A Streptokokken Plasmids pA996.** Es wurden sechs offene Leseraster gefunden, welche Polypeptide > 50 Aminosäuren kodieren. ORF1 und ORF2 zeigen sehr hohe Homologien zu Genen des *S. dysgalactiae* subsp. Plasmids pSdy132. ORF3 kodiert ein Replikationsinitiationsprotein. ORF4 – 6 kodieren unbekannte Faktoren. Bei dem Protein, welches von ORF5 kodiert wird, konnte ein Signalpeptid vorhergesagt werden.

Für den ORF5 wurden ebenfalls keine Homologien gefunden, jedoch wurde eine potentielle Schnittstelle für eine Peptidase zwischen den Aminosäuren 29 und 30 vorhergesagt. Dies deutet darauf hin, dass ein reifes Protein von 14,8 kDa durch das sec-abhängige Transportsystem sekretiert wird. Für dieses wurde ein Hydrophobizitätsverhältnis von 43% mit einer Ladung von +2 bestimmt (Wang, 2004 & 2009). Das Protein könnte demnach mit Membranen interagieren (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16: Aminosäuresequenz des durch ORF5 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.** Die hydrophoben Aminosäuren des reifen Proteins sind rot dargestellt. Es lag ein Hydrophobizitätsverhältnis von 43% vor. Durch die Anwendung des Programms SOPMA konnte eine alphahelikale Struktur von 40% des Proteins vorhergesagt werden (Alpha-helix „h“; random coil „c“). Das Protein könnte demnach mit Membranen interagieren.

ORF6 befindet sich auf dem komplementären DNA Strang der bisher beschriebenen ORFs. Es konnte kein Signalpeptid des sec-abhängigen Transportsystems vorhergesagt werden. Jedoch wurde mit Hilfe des Programms SecretomeP 2.0 (Bendtsen, 2005) eine Sekretion auf nicht klassischem Weg vorhergesagt. Das 60 Aminosäuren lange Peptid (7,2 kDa) zeigte ein Hydrophobizitätsverhältnis von 50%. Es wurde eine Ladung von +10 festgestellt (Wang, 2004 & 2009) und damit eine mögliche Interaktion mit Membranen vorhergesagt (Abbildung 3.17).

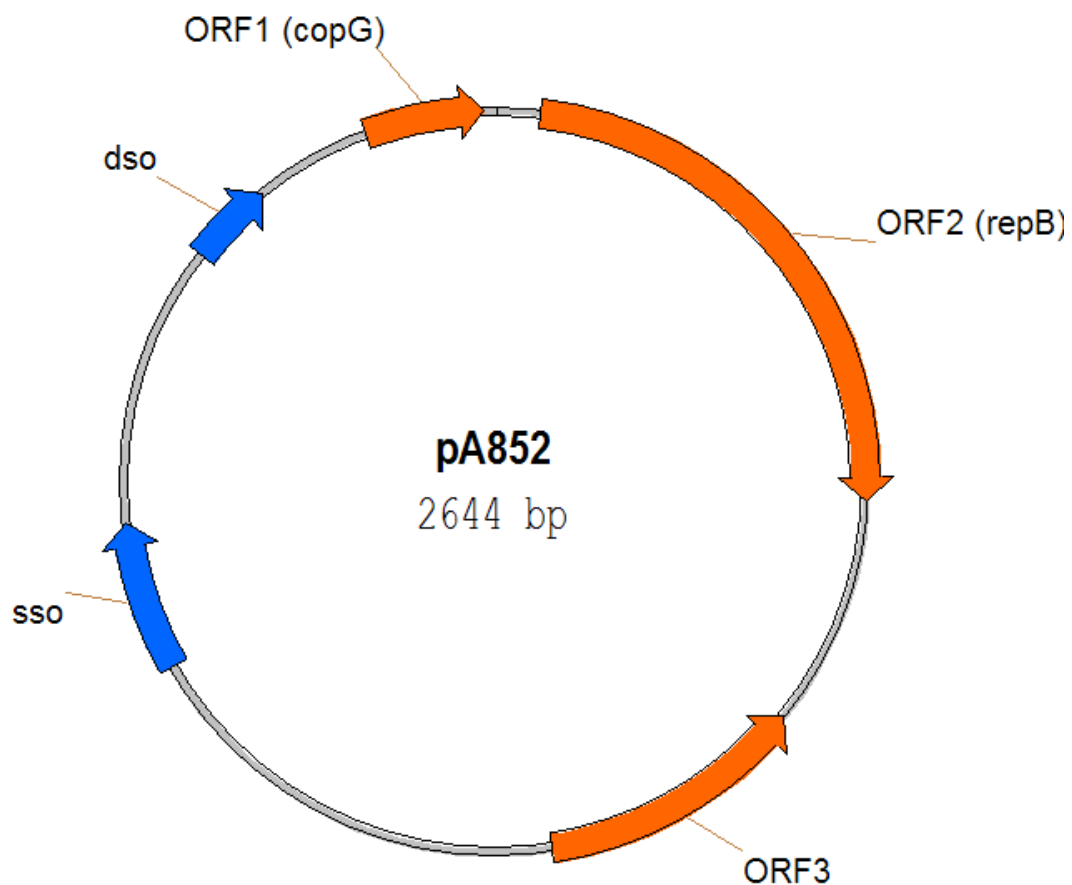


**Abbildung 3.17: Aminosäuresequenz des durch ORF6 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.** Die hydrophoben Aminosäuren des reifen Proteins sind rot dargestellt. Es lag ein Hydrophobizitätsverhältnis von 50% vor. Durch die Anwendung des Programms SOPMA konnte eine alphahelikale Struktur von 42% des Proteins vorhergesagt werden (Alphahelix „h“; random coil „c“). Das Protein könnte demnach mit Membranen interagieren.

Aufgrund der geringen Größe, der Vorhersage einer sec-unabhängigen Sekretion und der möglichen Interaktion des Peptids mit Membranen, lag hier möglicherweise ein Bakteriocin vor.

### 3.5.4.2 *Streptococcus pyogenes* Plasmid pA852

Das Plasmid pA852 des Isolates A852 (*emm11.0*) hat eine Größe von 2644 bp mit einem GC Gehalt von 34,46%. Es wurden drei ORFs identifiziert, die Polypeptide >40 Aminosäuren kodieren (Abbildung 3.18). ORF1 hat eine Homologie von 92% mit dem *copG* Gen (*copy control protein*) vom Plasmid pDN281 aus *Streptococcus pyogenes* (Heng, GenBank: AY995189) bzw. 91% Homologie zum *Streptococcus agalactiae* Plasmid pMV158 (van der Lelie, 1989). *copG* kodiert ein 5 kDa großes Repressorprotein, welches die Kopienzahl des Plasmids aufrecht erhält. ORF2 zeigte 85% Homologie zum *repB* Gen von Plasmid pMV158 aus *Streptococcus agalactiae* (van der Lelie, 1989).



**Abbildung 3.18: Vektorkarte des Gruppe A Streptokokken Plasmids pA852.** Es wurden drei offene Leseraster gefunden, welche Polypeptide > 40 Aminosäuren kodieren. ORF1 und ORF2 zeigen sehr hohe Homologien zu Genen des *Streptococcus agalactiae* Plasmids pMV158. ORF3 kodieren einen extrazellulären unbekannten Faktor.

Des Weiteren wurden ein *double-strand* Replikationsursprung, welcher während der Initiation der Plasmidreplikation durch RepB *ge-nicked* wird, und ein *single-strand* Replikationsursprung, welcher essentiell für die Konversion des ssDNA Intermediates in die doppelsträngige Form ist, identifiziert (del Solar, 1998; Khan, 2005).

Der putative SSO vom Plasmid pA852 enthielt eine hoch konservierte 14 bp lange Sequenz (-TTTATGCCGTGAAA-). Es wird angenommen, dass diese sogenannte RS<sub>B</sub> Sequenz während der Initiation der *lagging-strand* Synthese mit der RNA Polymerase interagiert (Kramer, 1998; Khan, 2005). Die RS<sub>B</sub> Sequenz ist ein charakteristisches Merkmal vom *ssoA*, dem am häufigsten gefundenen *sso* in *rolling-circle* Plasmiden grampositiver Spezies, unabhängig von der Plasmidfamilie (Khan, 2005). Alle Komponenten der Replikationsmaschinerie vom Plasmid pA852 zeigen signifikante Homologien zum Prototyp pMV158 dieser Plasmidfamilie (Moscato, 1995), sowie zu anderen Mitgliedern der pMV158 Plasmidfamilie, wie dem Plasmid pDN281 aus *Streptococcus pyogenes* (Heng, GenBank: AY995189), dem Plasmid pW2580 aus *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Heng, 2006), dem Plasmid pSSU1 aus *Streptococcus suis* (Takamatsu, 2000) und dem Plasmid pER13 aus *Streptococcus thermophilus* (Solow, 2000).

ORF3 befindet sich auf dem komplementären DNA Strang der bisher beschriebenen Faktoren. Das Leseraster kodiert ein Protein von 10,7 kDa mit vorhergesagter Signalpeptidsequenz (Aminosäuren 1 – 30). Das reife Protein hätte eine Größe von 7,4 kDa. Es konnten weder auf Nukleotidebene noch auf Grundlage der Aminosäuresequenz Homologien zu bekannten Faktoren festgestellt werden.

Das reife Protein, mit einer Länge von 72 Aminosäuren (7,4 kDa), zeigte ein Hydrophobizitätsverhältnis von 41%. Es wurde eine Ladung von +3 festgestellt (Wang, 2004 & 2009). Des Weiteren wurde eine alphahelikale Sekundärstruktur vorhergesagt. Das Protein könnte demnach mit Membranen interagieren. Durch die beiden Cysteine wäre die Ausbildung von Disulfidbrücken möglich (Abbildung 3.19).

10            20            30            40            50            60            70  
 |            |            |            |            |            |            |  
 QSDSLGNSPADAIIDKITYRNLSPQEKRRIDQARANNAKCLAKAGISAVGAYATGGSASAASAFLLTLASCGW  
 cccccccchhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccch            cccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhcc

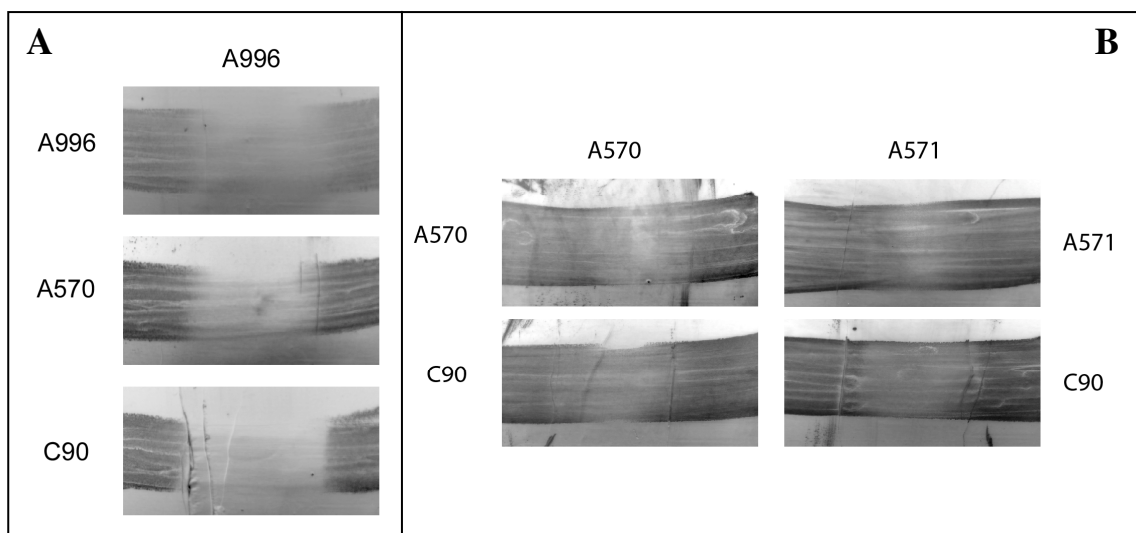
**Abbildung 3.19: Aminosäuresequenz des durch ORF3 kodierten reifen Proteins und Vorhersage der Sekundärstruktur.** Die hydrophoben Aminosäuren des reifen Proteins sind dargestellt. Es lag ein Hydrophobizitätsverhältnis von 41% vor. Durch die Anwendung des Programms SOPMA konnte eine alphahelikale Struktur mit 56% vorhergesagt werden (Alpha-helix „h“; random coil „c“). Das Protein könnte demnach mit Membranen interagieren. Durch die beiden Cysteine (gelb hinterlegt) wäre eine intramolekulare bzw. intermolekulare Ausbildung von Disulfidbrücken möglich.

### 3.5.5 Funktionelle Charakterisierung von ORF5 des Plasmids pA996

Es wurde beschrieben, dass ORF6 des Plasmids pA996 möglicherweise ein Bakteriocin kodiert. Eine allgemein verwendete Methode zur Überprüfung der Produktion eines Bakteriocins ist der Wachstumsinhibitions-Assay (*deferred antagonism* Assay).

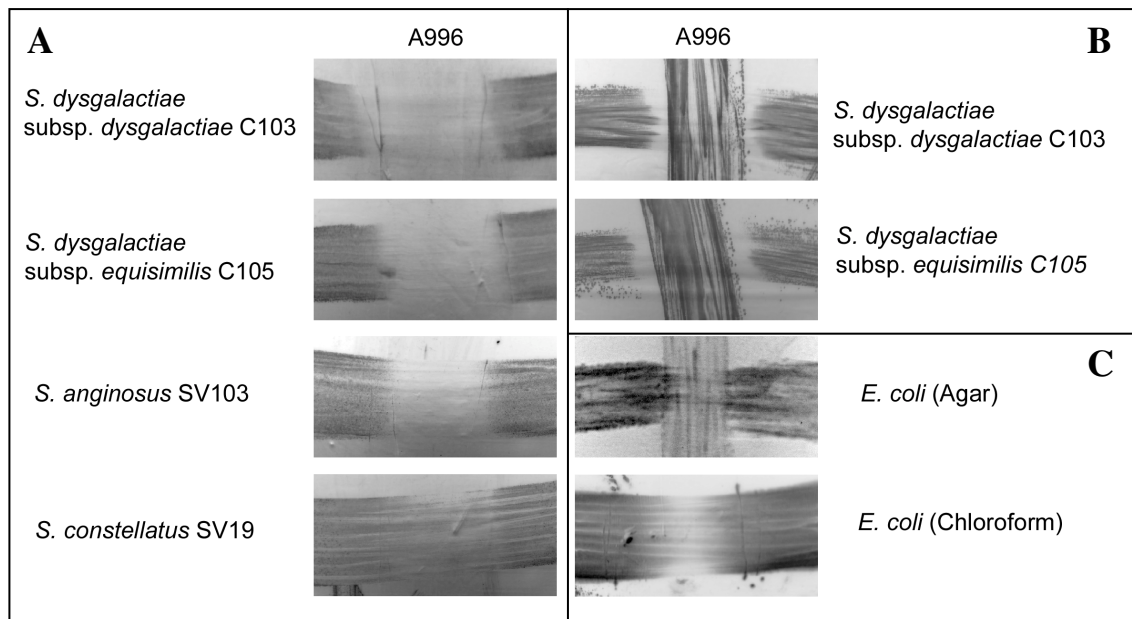
#### 3.5.5.1 Wachstumsinhibitions-Assay mit dem Isolat A996 als Teststamm

Dieser Wachstumsinhibitions-Assay zur Überprüfung einer Bakteriocinproduktion wurde mit dem Streptokokkenisolat A996 (*emm44.0*) als Teststamm durchgeführt. Zunächst wurden die Isolate A570 (*Streptococcus pyogenes*), C90 (*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) und das Isolat A996 selbst als Indikatorstamm ausgewählt. Als Kontrollen (Teststamm) dienten die Isolate A570 und A571, deren Genome sequenziert sind und keine Bakteriocine aufweisen (Beres, 2002; Smoot, 2002). Die Ergebnisse des mit Chloroform durchgeführten Wachstumsinhibitions-Assays sind in Abbildung 3.20 dargestellt.



**Abbildung 3.20: Wachstumsinhibitions-Assay. (A)** Der Teststamm A996 wurde hierfür auf eine THY-Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Kultivierungsphase über Nacht wurde der überwiegende Teil der Bakterien von der Platte abgenommen und die auf der Platte verbleibenden Bakterien durch Chloroformgas abgetötet. Die Indikatorstämme A570, A996 und C90 wurden nach dem Verdampfen des Chloroforms orthogonal zum Teststamm ausgestrichen. Es zeigte sich ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf die Indikatorstämme A570 und C90. **(B)** Als Kontrollen (Teststamm) dienten die Isolate A570 und A571, welche keine Bakteriocine aufweisen. Es zeigte sich keine Wachstumsinhibition der Indikatorstämme.

Bei den Kontrollisolaten A570 und A571 konnte kein inhibitorischer Effekt auf die Indikatorstämme beobachtet werden. Der Teststamm A996 hingegen hatte einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Indikatorstämme A570 und C90. Interessanterweise schien er sein Wachstum selbst schwach zu inhibieren. Bei weiteren Untersuchungen wurden Isolate verschiedener Spezies als Indikatorstamm untersucht, wobei in Abbildung 3.21 nur exemplarisch die Isolate *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* C103, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* C105, *S. anginosus* SV103, *S. constellatus* SV19 und *E. coli* dargestellt sind.



**Abbildung 3.21: Wachstumsinhibitions-Assay mit dem Isolat A996 als Teststamm.** Als Indikatorstämme wurden verschiedene Isolate der Spezies *Streptococcus* und *E. coli* verwendet. (A) Der Teststamm A996 wurde hierfür auf eine THY-Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Kultivierungsphase über Nacht wurde der überwiegende Teil der Bakterien von der Platte abgenommen und die auf der Platte verbleibenden Bakterien durch Chloroformgas abgetötet. Es zeigte sich eine deutliche Wachstumsinhibition der Isolate C103, C105 und SV103. Das Wachstum des Isolats SV19 wurde nur schwach inhibiert. (B) Dieselben Resultate wurden bei dem mit THY-Agar überschichteten Teststamm A996 beobachtet. (C) Als einziger Vertreter eines gramnegativen Bakteriums wurde *E. coli* als Indikatorstamm getestet. Es wurden ebenfalls die Chloroform- und Agarmethode verwendet. Bei beiden Versuchsansätzen war eine schwache Wachstumsinhibition zu erkennen.

Abbildung 3.21 A zeigt eine deutliche Wachstumsinhibition der Isolate C103, C105 und SV103. Das Wachstum des Isolats SV19 wurde nur schwach inhibiert. Der Wachstumsinhibitionsversuch wurde ebenfalls mit THY-Agar überschichtetem Teststamm durchgeführt (Abbildung 3.21 B). Senkrecht ist das Isolat A996 zu sehen. Die Indikatorstämme wurden orthogonal auf die frisch gegossene Agarschicht ausgestrichen. Es war eine eindeutige Zone der Wachstumsinhibition zu erkennen. Als einziger Vertreter eines Gram-negativen Bakteriums wurde *E. coli* als Indikatorstamm

getestet (Abbildung 3.21 C). Hier wurden ebenfalls die Chloroform- und Agarmethode verwendet. Bei beiden Versuchsansätzen war eine schwache Wachstumsinhibition zu erkennen.

Tabelle 3.12 zeigt eine Übersicht getesteter Indikatorstämme. Das Isolat A996 inhibierte das Wachstum aller getesteten *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. intermedius* und *S. gordonii*. Im Gegensatz dazu konnten nicht alle Isolate der Spezies *S. anginosus*, *S. oralis* und *S. salivarius* inhibiert werden. Die Spezies *S. agalctiae*, *S. mitis* und *S. parasanguis* zeigten keine Wachstumsinhibition.

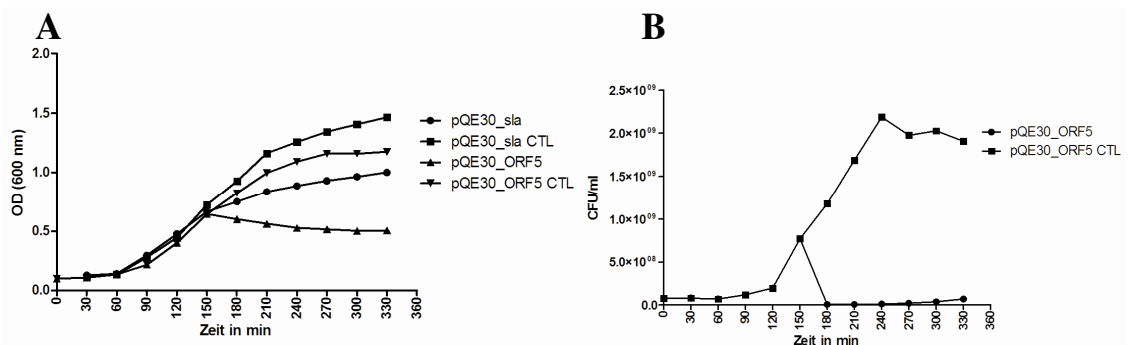
**Tabelle 3.12: Übersicht der Wachstumsinhibition von verschiedenen Indikatorstämmen, verursacht durch das *S. pyogenes* Isolat A996.**

Indikatorstamm	Wachstumsinhibition
<i>S. pyogenes</i>	12/12
<i>S. agalctiae</i>	0/1
<i>S. anginosus</i>	3/5
<i>S. constellatus</i>	8/10
<i>S. dysgalactiae dysgalactiae</i>	4/4
<i>S. dysgalactiae equisimilis</i>	7/7
<i>S. gordonii</i>	2/2
<i>S. intermedius</i>	3/3
<i>S. mitis</i>	0/6
<i>S. oralis</i>	3/8
<i>S. parasanguis</i>	0/7
<i>S. salivarius</i>	2/3

### 3.5.5.2 Klonierung des ORF5

Die oben beschriebenen Wachstumsinhibitionsversuche und die computergestützten Vorhersagen gaben den Hinweis einer Bakteriocinproduktion des Isolats A996. Um dies zu überprüfen wurde das Gen für das reife Protein des ORF5 in das pQE30 System kloniert. Es war jedoch nicht möglich, das rekombinante Protein zu gewinnen. Es wurde beobachtet, dass nach Induktion der Überexpression die optische Dichte (OD) der *E. coli* Kultur konstant blieb bzw. leicht abnahm. Die parallel durchgeführte Plattierung ergab, dass die Bakterienzahl nach Induktion der Überexpression drastisch abnahm (Abbildung 3.22).

Der verwendete Kontrollstamm *E. coli* pREP4 pQE30\_sla zeigte nach der Induktion ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle. Dies ist aber durch die Proteinüberexpression zu erklären.

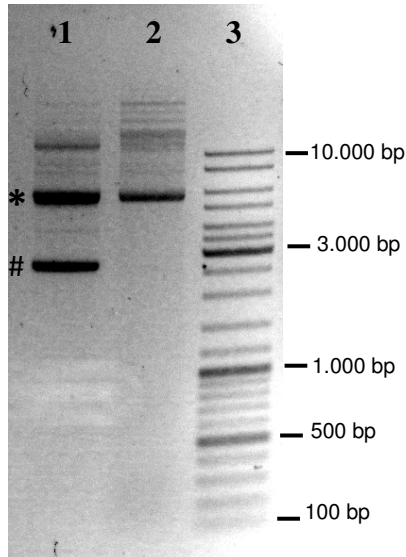


**Abbildung 3.22: Wachstumskurve und Ergebnisse der Plattierung.** (A) Nach dem Wachstum des *E. coli* Stammes M15 pREP4 mit den angegebenen Plasmidkonstrukten bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 0,1M IPTG induziert. Als Kontrollen dienten nicht-induzierte Stämme. Es wurde kein weiteres Wachstum des Stammes mit dem Vektor pQE30\_ORF5 nach Induktion der Proteinexpression verzeichnet. Die OD nahm leicht ab. Der nicht induzierte Stamm wuchs weiter. (B) Parallel durchgeführte Plattierungen zeigten die drastische Abnahme der Bakterienzahl nach Induktion der Proteinexpression. Als Kontrolle diente der Stamm *E. coli* M15 pREP4 pQE30\_sla. Dieser zeigte nach der Induktion ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle.

Nach 3 h Induktion der Überexpression des reifen Proteins des ORF5 wurde ein Aliquot von der Kultur entnommen und eine Plasmidpräparation durchgeführt. In Abbildung 3.23 Spur 1 wurde die Plasmidpräparation einer nicht-induzierten Übernachtskultur aufgetragen. Zu erkennen sind die Plasmide pREP4 (\*) und pQE30\_ORF5 (#). In Spur 2 wurde die Plasmidpräparation der induzierten Kultur aufgetragen. Es war lediglich der Vektor pREP4 zu erkennen.



Eine PCR mit dieser Probe als Template und den spezifischen pQE Primern zur Amplifikation des Inserts ergab, dass das Plasmid mit Insert vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration dieses war jedoch so gering, dass das Plasmid nicht im Agarosegel sichtbar war.



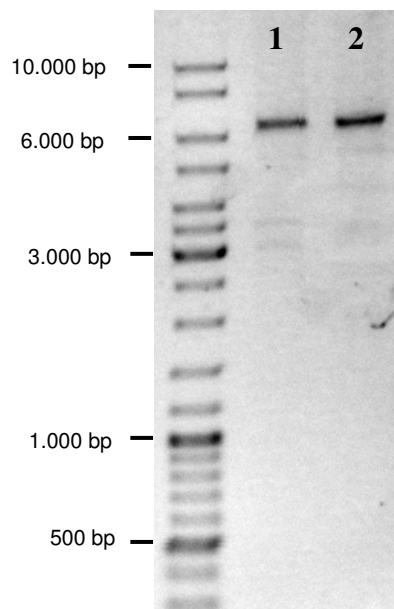
**Abbildung 3.23: Agarosegelelektrophorese der Plasmidpräparation aus *E. coli* pREP4 pQE30\_ORF5.** In Spur 1 sieht man die Plasmidpräparation einer Übernachtskultur. Es sind die Plasmide pREP4 (\*) und pQE30\_ORF5 (#) zu erkennen. In Spur 2 sieht man die Plasmidpräparation 3 h nach Induktion der Proteinüberexpression. Zu erkennen ist das Plasmid pREP4. Der Vektor pQE30\_ORF5 ist im Gel nicht mehr zu erkennen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Isolat A996 einen wachstumsinhibitorischen Effekt auf Bakterien verschiedener Spezies hat. Die computergestützten Analysen ergaben, dass ORF5 des Plasmids pA996 ein sekretiertes Protein kodiert, welches ein potentiell Bakteriocin darstellt. Diese Hinweise wurden durch die Klonierung des reifen Proteins des ORF5 bekräftigt. Es war nicht möglich das rekombinante Protein zu erhalten, da die Anzahl lebensfähiger *E. coli* nach Induktion der Proteinüberexpression drastisch abnahm. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Konzentration des Plasmids pQE30\_ORF5 dieser Kultur abnahm, so dass dieses im Agarosegel nicht mehr sichtbar war. Dies indiziert die Expression eines toxischen Proteins.

### 3.5.6 Plasmide in Gruppe C und G Streptokokken

Es wurde gezeigt, dass 58 Isolate aus 13 verschiedenen Serotypen ein Plasmid besaßen. Dies entspricht 20,79% der in Indien isolierten Gruppe A Streptokokken. Da das Plasmid pSdyT132 mit dem Bakteriocin Dysgalacticin erstmalig in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Lancefieldgruppe G) beschrieben wurde, sollte die Präsenz von Plasmiden in Gruppe C und G Streptokokken untersucht werden. Es wurden insgesamt 313 Streptokokkenisolate dieser Gruppen untersucht (59 Isolate *Streptococcus anginosus*; 254 Isolate *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*). Lediglich drei Isolate der Spezies *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* zeigten Amplifikationsprodukte mit den spezifischen Primern für die Gene *repA* und *repB*. Bei *Streptococcus anginosus* konnten keine Plasmide detektiert werden.

Bei den Isolaten G271 (Serotyp stG652.0) und C118 (stG485.0) konnte das Gen *repB* amplifiziert werden, das Isolat G279 (stG6.0) besaß das *repA* Gen. Bei weiteren Isolaten derselben Serotypen konnten keine Plasmide detektiert werden. Bei keinem der Plasmide der Gruppe C und G Streptokokken wurden die Bakteriocine Dysgalacticin und SA-M57 mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Bei der Amplifikation der Plasmide mit dem Gen *repB* stellte sich heraus, dass diese eine Größe von ca. 6200 bp zeigten und somit wesentlich größer waren als die Plasmide der Gruppe A Streptokokken (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24: Amplifikate der Plasmide von Gruppe C und G Streptokokken.** Mit den Primern *repB fwd* und *repB2 rev* wurden Plasmide bei den Isolaten C118 (1) und G271 (2) amplifiziert.

## 4 Diskussion

*Streptococcus pyogenes* ist ein wichtiges bakterielles Humanpathogen, welches den Rachenraum oder die Haut besiedelt und ein breites Spektrum an Erkrankungen hervorruft. Es treten unkomplizierte Infektionen wie Pharyngitis und lokale Infektionen der Haut (Impetigo, Erysipelas, Cellulitis) oder Scharlach auf. Zu den lebensbedrohlichen invasiven Erkrankungen zählen Pneumonie, Bakteriämie, nekrotisierende Fasciitis und *streptococcal toxic shock* Syndrom. Folgeerscheinungen einer Streptokokkeninfektion können akutes rheumatisches Fieber, Arthritis und Glomerulonephritis sein (Cunningham, 2000; Pfoh, 2008).

Seit Mitte der 1980er Jahre treten immer wieder schwere systemische Streptokokkeninfektionen und Ausbrüche des *streptococcal toxic shock* Syndroms auf (Stromberg, 1991; Bronze, 1996; Agüero, 2008), welche mit Mortalitätsraten von 30 – 60% verbunden sind, da es für diese Art der Erkrankung keine wirkungsvolle Therapie gibt (Stevens, 1995). Obwohl verschiedene Serotypen das Potenzial haben invasive Erkrankungen zu verursachen, werden bei 50% der Fälle in industrialisierten Ländern die Serotypen *emm1*, *emm28*, *emm3* und *emm12* isoliert (Steer, 2009). Es wird deshalb angenommen, dass es einen Zusammenhang zwischen Serotyp bzw. dem Serotyp spezifischen Virulenzgenrepertoire und dem Ausbruch einer Erkrankung gibt. Es wurde ebenfalls postuliert, dass eine Änderung des Genrepertoires einzelner Gruppe A Streptokokkenstämme zu einem häufigeren Auftreten invasiver Erkrankungen führte (Musser, 1995; Aziz, 2005; Sumby, 2005). Zahlreiche Virulenzfaktoren, die zur Pathogenese beitragen, wurden ausführlich charakterisiert und beschrieben.

## 4.1 Vergleich der *emm*-Typ Distribution von Gruppe A Streptokokken aus industrialisierten Ländern und Indien

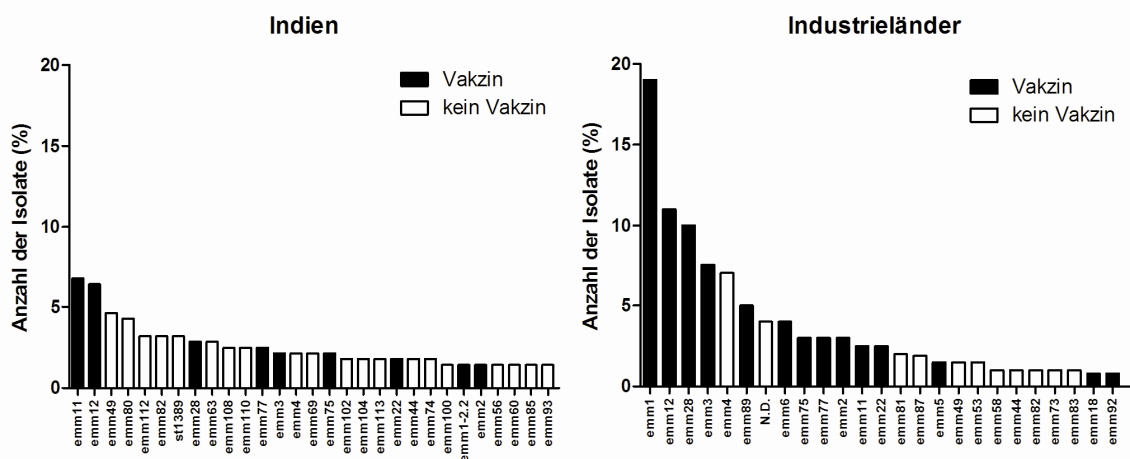
Der kürzlich erschienene Übersichtsartikel von Steer (Steer, 2009) fasst die globalen Datensätze von 102 Publikationen (mit 38081 Isolaten) über die Verteilung der *emm*-Typen zusammen und vermittelt einen umfassenden Überblick. Es wurden signifikante Unterschiede in der Distribution und Diversität der *emm*-Gene festgestellt. So lag in Afrika und der pazifischen Region (australische Ureinwohner eingeschlossen) eine heterogene Verteilung der *emm*-Typen vor. Länder mit hohem Einkommen (Europa, Nordamerika, Australien, Neuseeland und Japan), Asien, dem mittleren Osten und Lateinamerika zeigten eine homogene Verteilung der *emm*-Typen.

Im Gegensatz dazu sind Daten über die Distribution der *emm*-Typen und deren Assoziation mit einer Krankheit für Indien nur in geringem Maße publiziert. Sagar (Sagar, 2008) untersuchte zum Beispiel die *emm*-Typ Distribution von Gruppe A Streptokokken Isolaten aus Chandigarh (Nordindien). Es wurden 37 verschiedene *emm*-Typen (bei 94 Isolaten) gefunden, jedoch gab es keine signifikante Assoziation von Serotyp und Erkrankung (Rachen und Haut). Die Ergebnisse der Arbeit zeigten aber, dass die am häufigsten vorkommenden Serotypen in Chandigarh (*emm*49.4, *emm*112.2, *emm*1-2.2, *emm*75.0, *emm*77.0) nicht mit den prävalenten Serotypen der industrialisierten Länder (siehe unten), wie Deutschland, Australien, den USA oder Japan, übereinstimmen. In Südindien hingegen wurden die Serotypen *emm*11, *emm*82, *emm*105, *emm*108, *emm*100 und *emm*112 als am häufigsten auftretende Serotypen beschrieben (Sharma, 2006). Auch hier zeigte sich, dass diese nicht mit den dominierenden Serotypen der Industrieländer übereinstimmten.

Die vorliegende Arbeit als Teil des ASSIST-Projektes sollte einen tieferen Einblick in das aktuelle indische Szenario geben. Die Gruppe A Streptokokken wurden in den Jahren 2007-2010 isoliert.

Es ist bekannt, dass in den industrialisierten Ländern 25 *emm*-Typen ca. 90% der Isolate bestimmten, wohingegen die restlichen 10% der Isolate 146 verschiedene *emm*-Typen aufwiesen. Die Daten aus zwei geographischen Regionen in Indien ergaben, dass hier die 25 am häufigsten isolierten *emm*-Typen nur 68% der Isolate präsentierten (Abbildung 4.1). Die restlichen 32% wurden durch 52 verschiedene Serotypen vertreten. Es wurden keine dominanten Serotypen gefunden. Die vier am häufigsten isolierten *emm*-Typen waren *emm*11, *emm*12, *emm*49 und *emm*80. Diese entsprachen 22% der gesamten Isolate. In den industrialisierten Ländern präsentierten die vier am häufigsten isolierten *emm*-Typen (*emm*1, *emm*12, *emm*28 und *emm*3) ca. 50% der gesamten Isolate, wobei *emm*1 der dominierende Serotyp war und ca. 20% der Isolate ausmachte. Auffällig war, dass der Serotyp *emm*1 in Indien nicht anzutreffen war. Isolate mit dem Serotyp *emm*12 wurden in Indien mit 6,4% und in den

industrialisierten Ländern mit 12% häufig isoliert. Die Serotypen *emm3* und *emm28* spielten bei den industrialisierten Ländern eine wichtige Rolle. Jeweils 10% der durch Streptokokken verursachten invasiven Erkrankungen wurden von diesen verursacht. In Indien hingegen traten diese Serotypen nur zu 2,2% bzw. 2,9% auf. Einige der am häufigsten auftretenden Serotypen der industrialisierten Länder sind unter den untersuchten indischen Isolaten nicht bzw. mit weniger als drei Isolaten zu finden. Neben dem schon erwähnten Serotyp *emm1* sind die *emm*-Typen *emm87*, *emm5* und *emm73* nicht in Indien vertreten. Die Serotypen *emm89*, *emm6*, *emm81* und *emm58* traten nur vereinzelt auf.



**Abbildung 4.1: Vergleich der am häufigsten auftretenden Serotypen von Gruppe A Streptokokken in Indien und in den Industrieländern.** In den industrialisierten Ländern bestimmen 25 *emm*-Typen ca. 90% der Isolate, wobei die vier dominanten *emm*-Typen *emm1*, *emm12*, *emm28* und *emm3* ca. 50% der Isolate repräsentieren. In Indien hingegen präsentieren die 25 häufigsten *emm*-Typen lediglich 68% der Isolate. Es wurden keine dominanten Serotypen gefunden. 22% der Isolate wiesen die *emm*-Typen *emm11*, *emm12*, *emm49* und *emm80* auf. *emm*-Typen, welche ein Teil des M Protein-basierten Impfstoffs sind, wurden in schwarz dargestellt.

Im Gegensatz dazu wurden in Indien zahlreiche Serotypen häufig isoliert, welche in den industrialisierten Ländern nicht unter den 25 häufigsten Typen zu finden waren, so z. B. *emm80*, *emm112*, *st1389* und *emm63*. Diese Unterschiede in der Distribution der *emm*-Typen in Indien und den Industrieländern haben Konsequenzen hinsichtlich der Entwicklung eines M Protein-basierten Impfstoffs.

Das M Protein ist hoch immunogen. Es konnte gezeigt werden, dass Serum, welches serotypspezifische Antikörper enthält, protektiv gegen eine Re-Infektion mit demselben Serotyp ist (Lancefield, 1959 & 1962). Auf Grundlage dieser Studien wurde ein 26-valentes M Protein-basiertes Vakzin entwickelt und als sicher und immunogen getestet (McNeil, 2005). Dieses Vakzin deckt zahlreiche der häufig auftretende Serotypen in den Industrieländern, vor allem den USA, Kanada und Europa, ab. Da die in Indien isolierten Serotypen stark von denen in Europa abweichen, würde hier nur eine geringe Abdeckung erreicht werden (Abbildung 4.1). Eine alternative Auswahl an

verschiedenen Serotypen müsste für Indien getroffen werden, bzw. es müsste eine größere Anzahl an Serotypen in das bestehende Vakzin integriert werden.

Eine andere Herangehensweise ist die Selektion von konservierten Antigenen, wie C5a Peptidase, das Gruppe A Streptokokken-Karbohydrat und das als J8 bekannte Peptid einer konservierten Region des M Proteins (Sabharwal, 2006; Shet, 2003; Batzloff, 2003), um einen serotypübergreifenden Impfstoff zu entwickeln.

### 4.2 Kollagen IV Bindung

Ein charakteristisches Merkmal rheumatogener Streptokokkenisolate ist die Bindung von Kollagen. Die direkte Bindung von Kollagen IV auf der Bakterienoberfläche wird deshalb als einer der Schlüsselmechanismen in der Entstehung von ARF betrachtet. Diese Bindung wurde bisher ausschließlich für die Hyaluronsäurekapsel und das M3 Protein bei *Streptococcus pyogenes* beschrieben. Weiterführende Studien identifizierten eine Sequenz von acht Aminosäuren (A/E/T)XYLXXLN als Kollagenbindungsmotiv, das sogenannte PARF-Motiv (*peptide associated with rheumatic fever*). Dieses Motiv vermittelt die Bindung der CB3 Region von Kollagen IV (Dinkla, 2009) an das M3 Protein von *Streptococcus pyogenes* und an das M Protein FOG von *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Dinkla, 2007; Barroso, 2009).

Neben den Isolaten des Serotyps M3 und zahlreichen Serotypen, die eine kapselabhängige Kollagen IV-Bindung zeigten, wurde der Serotyp M74 positiv für eine Bindung getestet. Die Hyaluronsäurekapsel konnte nicht eindeutig als Bindungsfaktor identifiziert werden, da die Isolate nach Verdau der Kapsel weiterhin eine hohe Bindung zeigten. Daher wurde eine proteinvermittelte Bindung vermutet. Durch *Dot Blot* Experimente wurde das M74 Protein jedoch ebenfalls als Interaktionspartner ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde kein PARF Motiv in der Aminosäuresequenz des M74 Proteins identifiziert. Dies bestätigt die Hypothese, dass ausschließlich M Proteine mit PARF Motiv eine Kollagen IV-Bindung vermitteln. Weiterführende Experimente zeigten, dass der Bindungsmechanismus der M74 Isolate ein anderer als bei bekapselten M18 Isolaten und M3 Isolaten ist. Nach einer Hitzedenaturierung bei 95°C für 60 min wurde weiterhin eine Kollagenbindung der M74 Isolate beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollisolate der Serotypen M3 und M18 keine Bindung. Damit wurde erstmalig ein weiterer Bindungsmechanismus neben der Hyaluronsäurekapsel und dem M3 Protein bei *Streptococcus pyogenes* beschrieben.

Bei näherer Betrachtung der Aminosäuresequenz des Proteins M3.22 wurde ein nicht perfektes PARF Motiv identifiziert (Abbildung 3.5). Entgegen der Hypothese, dass ausschließlich M Proteine mit perfektem PARF Motiv eine Kollagen IV-Bindung zeigen, wurde hier eine Interaktion nach Kapselverdau festgestellt. Die Bindung gegenüber den Isolaten des Serotyps M3.23 war jedoch reduziert. Der direkte Beweis, dass die verminderte Kollagenbindung durch das nicht perfekte PARF Motiv des M3.22 Proteins hervorgerufen wird, wurde jedoch nicht erbracht.

### 4.3 Microarrayanalyse

Mit Hilfe des Microarray war es möglich das Virulenzgenrepertoire von 201 Streptokokkenisolaten zu untersuchen. Es wurde ein Kerngenom von 91 Genen bestimmt. Dies beinhaltet neben *housekeeping* Genen Schlüsselvirusfaktoren, deren Funktionen kritisch für das Überleben des Pathogens sind. Zusätzlich zu diesem Kerngenom wurden bei jedem Isolat Gene detektiert, welche zu verschiedenen genotypischen Charakteristika führten. Durch die ermittelten genotypischen Merkmale wurden verschiedene Clustergruppen identifiziert, welche zum Teil mit den Serotypen übereinstimmten. Es stellte sich heraus, dass die bakteriophagenassoziierten Gene enorm zur genetischen Variabilität beitragen. Die Gruppen der Adhäsine und Fibronectinbindungsproteine zeigten ebenfalls eine heterogene Verteilung.

Zur Validierung der erhaltenen Arraydaten wurden Kontroll-PCRs durchgeführt. Hierfür dienten die Gene der Superantigene *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* und *smeZ*. Beim Vergleich der Arraydaten mit den Ergebnissen der PCR wurde ein mittlerer Fehler von 6,11% festgestellt. Dabei wurden 2,76% der Gene falsch-negativ bzw. 3,35% der Gene falsch-positiv durch den Array klassifiziert. Die Validierung mittels PCR kann jedoch ebenfalls fehlerbehaftet sein und falsch-neagative Ergebnisse liefern. Die Primer wurden für konservierte Sequenzabschnitte der Gene entwickelt, jedoch ist eine veränderte Nukleotidsequenz nicht auszuschließen. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass zahlreiche durch den Array falsch-positiv klassifizierten Gene eine Korrelation mit bestimmten Serotypen zeigten. Ebenso können Allele von Genen auftreten, welche durch die Sonden des Microarray nicht mehr detektiert werden können.

#### 4.3.1 Vergleich der Gendistribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten

Wie in Tabelle 3.6 gezeigt wurde, gab es nur geringfügige Unterschiede im Virulenzgenrepertoire der invasiven und nicht-invasiven Isolate. Mit Hilfe des DNA-Microarray konnten lediglich sechs Gene identifiziert werden, welche signifikant häufiger bei invasiven Isolaten detektiert wurden, wobei vier dieser Gene nicht charakterisierte Faktoren kodieren. Die zwei charakterisierten Faktoren waren *streptococcal protective antigen* (spyM18\_2046) und die Deoxyribonuclease *mf3* (SPy1436). Zwei der nicht charakterisierten Faktoren (hypothetische Proteine; spyM18\_0480, spyM18\_0477) stammen aus dem rheumatogenen M18 Streptokokkenisolat MGAS8232, je ein Faktor stammt aus dem M1 Isolat SF370 und dem M3 Isolat MGAS315.

Alle Gruppe A Streptokokken besitzen ein oder mehrere Gene für DNasen (Ferreira, 1992; McCarty, 1948). Es ist höchstwahrscheinlich ein synergistischer Effekt dieser mit

etablierten Virulenzfaktoren, wie dem M Protein, der Hyaluronsäurekapsel und Streptolysinen, die dem Pathogen eine Resistenz gegen Phagozytose verleihen.

Buchanan (Buchanan, 2006) beschreibt den Einfluss der Streptodornase Sda1 auf das Entkommen eines M1 Streptokokkenisolates vor der Tötung durch Neutrophile, sowie die Degradation von *neutrophil extracellular traps*. Neutrophile töten Pathogene effektiv durch eine Reihe von Mechanismen, wie z. B. Phagozytose und/oder Degranulierung, proteolytische Enzyme und antimikrobielle Peptide, sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Ein noch recht neuer Mechanismus, die Induktion von *neutrophil extracellular traps* (NETs), wurde durch Brinkmann (Brinkmann, 2004) beschrieben. Der Autor spekuliert, dass durch diese Netze, bestehend aus chromosomaler DNA, Proteasen und antimikrobiellen Peptiden, eine effektive Tötung der Pathogene gewährleistet ist.

Durch die Expression von einer oder mehreren DNasen ist das Entkommen aus den *neutrophil extracellular traps* durch Degradation der DNA möglich. Sumbly (Sumbly, 2005) analysierte die Transkriptionsprofile zweier phagenassoziierten und einer chromosomalkodierten DNase des M1 Isolat MGAS5005. Des Weiteren wurde die DNase-Aktivität in Kulturüberständen von Mutanten mit verschiedenen Kombinationen von DNase-Knockouts untersucht. Die dreifach-Mutante zeigte keine DNase-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass das *sdaD2* Gen zu einem frühen Zeitpunkt des Wachstums transkribiert wurde und einhergehend eine hohe DNase-Aktivität zu verzeichnen war. Durch die Deletion des *sdaD2* Gens wurde die DNase-Aktivität stark reduziert. Durch die Deletionen der beiden anderen DNasen konnte diese starke Reduktion der Aktivität nicht beobachtet werden.

Diese Publikationen zeigen, dass DNasen eine wichtige Gruppe von Virulenzfaktoren sind, die dem Pathogen einen Vorteil verschaffen können. Da die Streptodornase mf3 (SPy1436) mit 44% etwa 10mal so häufig bei invasiven Isolaten zu finden war, kann spekuliert werden, dass diese eine wichtige Rolle bei der Entstehung invasiver Erkrankungen spielt, bzw. zum Überleben und zur Ausbreitung des Pathogens im Wirtsorganismus beiträgt. Zurzeit liegen allerdings keine Daten vor, welche die Expression bzw. Aktivität dieser DNase beschreiben.

Das Gene *spa* (*streptococcal protective antigen*) aus der Gruppe der chromosomalkodierten Faktoren zeigte einen signifikanten Unterschied in der Distribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten. Es war mit 59% ca. 5mal so häufig in den Isolaten zu finden, welche invasive Erkrankungen hervorrufen.

Spa (*streptococcal protective antigen*) wurde erstmalig von Dale (Dale, 1999) als protektives Antigen in M18 Isolaten beschrieben. Spa und M18 besitzen Epitope, welche opsonisierende Antikörper hervorrufen. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Spa und M18 synergistisch die komplementvermittelte Phagozytose in humanem Blut blockieren. Die Expression von Spa und M18 auf der Bakterienoberfläche ist für die Virulenz im Mausmodell essentiell (McLellan, 2001). In



Übereinstimmung mit der hier vorliegenden Studie wurde Spa in weiteren Serotypen detektiert (Ahmed, 2010), unter anderem in M36 Isolaten.

Die C-terminalen Regionen von Spa36 und Spa18 sind nahezu identisch und zeigen hohe Homologien zum C-terminalen Bereich des SeM Proteins von *S. equi* (McLellan, 2001). Die N-terminalen Sequenzen hingegen sind heterogen. Es wird deshalb postuliert, dass dieser Faktor durch horizontalen Gentransfer verbreitet wurde, und später unter dem Druck des Immunsystems divergierte (McLellan, 2001).

```

spa36      ATGTTTTTGAGAAATAAAAAGCAAAATTTAGCATCAGAAACTAAGTGCTGGTGCGAGCA 60
spa18      ATGTTTTTGAGAAATAAAAAGCAAAATTTAGCATCAGAAACTAAGTGCTGGTGCGAGCA 60
          *****

spa36      TCAGTATTAGTTGCAGCAAGTGTGTTGGGAGGGGCTGT---TGTAATGTACATGCGGAA 117
spa18      TCAGTATTAGTTGCAGCAAGTGTGTTGGGAGGGGCTGT---TGTAATGTACATGCGGAA 117
          *****

spa36      GATAGGATAAATAGTGATATA-----AATAGAAGAATAGTTGATAAAAAAGAC---GC 167
spa18      AGT-GGATTAGAGGTGGCAGACCCCTCTGATAGTAAGAACTTATTGAATTAGGTTTGGC 179
          *  ***  *   ***  *  *   ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *

spa36      TGAAAACCTTCGTAATGCGATTATTGCTAAAGGGGCGCGTTTAAAAAACGATTCTGAAGT 227
spa18      TAAATACCTTAATGATA-AATTACCCTTTAAAA-----CTAAAGAA-GATTGAGAGAT 230
          *  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

**Abbildung 4.2: Alignment der 5' Nukleotidsequenzen der Gene *spa18* und *spa36*.** Nach einem konservierten Bereich (Nukleotide 1 – 98) folgt der variable Bereich der Gene. Die 3' Sequenzen der Gene sind nahezu identisch. Die Sonde befindet sich im heterogenen Sequenzabschnitt (rote Markierung) und schien selektiv die Gene invasiver Isolate zu detektieren.

Diese Publikationen zeigen, dass Spa an der Immunabwehr beteiligt ist und dem Pathogen einen Vorteil im Überleben verschafft. Das Gen konnte in dieser Studie bei zahlreichen Isolaten mit Hilfe des Microarrays detektiert werden, wobei keine serotypabhängige Verteilung festgestellt wurde. Dies lag wahrscheinlich an der Heterogenität des Gens im 5' Bereich der Nukleotidsequenz, wie am Beispiel von *spa18* und *spa36* in Abbildung 4.2 dargestellt ist. Die 3' Sequenzen der Gene sind nahezu identisch. Die Sonde befindet sich im heterogenen Sequenzabschnitt und schien selektiv die Gene invasiver Isolate zu detektieren. So wurden vier invasive Isolate des Serotyps *emm49* positiv für die Präsenz des Gens getestet. Die fünf nicht-invasiven Isolate desselben Serotyps waren hingegen negativ. Es ist anzunehmen, dass diese ebenfalls das Gen *spa* besitzen, jedoch eine abweichende Nukleotidsequenz aufweisen. Spa stellt somit einen interessanten Kandidaten für weiterführende Untersuchungen dar.

Die Gene *spyM18\_0480* und *spyM18\_0477*, welche hypothetische Proteine kodieren, sind mit nur 4,2% bzw. 0,6% bei nicht-invasiven Isolaten detektiert wurden. Bei den invasiven Isolaten hingegen waren diese Faktoren in einem Drittel bzw. einem Fünftel präsent. Die Gene *spyM18\_0480* und *spyM18\_0477* kodieren zwei sekretierte Proteine, d.h. es wurde ein Signalpeptid vorhergesagt. Durch Datenbankanalysen wurden keine

Homologien gefunden, es konnten keine putativen konservierten Domänen vorhergesagt werden.

Im Gegensatz zur Studie der niederländischen Streptokokkenisolate, welche keine signifikanten Unterschiede in der Gendistribution zwischen invasiven und nicht-invasiven Isolaten zeigte (McMillan, 2006), wurden Unterschiede bei den indischen Isolaten detektiert. Diese Daten sind jedoch kritisch zu betrachten. Mit Hilfe des Microarrays konnte lediglich die Präsenz der Gene detektiert werden und nicht deren Expression im infizierten Wirt. Wie für das Gen *spa* beschrieben, müssten diese Resultate mit Hilfe der PCR überprüft werden. Desweiteren spielt die Expression dieser Gene eine entscheidende Rolle. Daher sollte die Produktion der Proteine durch einen Immunoassay nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Patientenseren könnte im ELISA bestimmt werden, ob die Proteine während der Pathogenese eine Rolle spielen und somit spezifische Antikörper gebildet wurden.

Neben den bakteriellen Virulenzfaktoren spielt der Wirt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Krankheitsverlaufes. Das Vorkommen eines bestimmten Allels (HLA-DRB1\*01) konnte in Zusammenhang mit Patienten gebracht werden, welche unter *poststreptococcal reactive arthritis* litten, einer Folgeerscheinung von Streptokokkeninfektionen, welche nicht die Jones Kriterien von akutem rheumatischen Fieber erfüllt (Ahmed, 1998; Shulman, 2002).

### 4.3.2 Vergleichende Distributionsanalyse zwischen indischen und niederländischen Isolaten anhand ausgewählter Gene

Wie schon durch die *emm*-Typisierung gezeigt werden konnte, gibt es in Indien keinen dominanten Serotyp. Die Diversität an M Proteinen ist größer als in den industrialisierten Ländern. So wurden z. B. 31 verschiedene *emm*-Typen in Indien während invasiver Erkrankungen isoliert. Ob die Diversität an Serotypen einen Einfluss auf die Distribution der Virulenzfaktoren hat, soll anhand eines Vergleichs von niederländischen und indischen Isolaten gezeigt werden. McMillan *et. al.* (McMillan, 2006) untersuchte 42 invasive und 26 nicht-invasive Isolate derselben Serotypen. In der Studie wurden die häufigsten invasiven *emm*-Typen (*emm1*, *emm3*, *emm6*, *emm28* und *emm89*) der Niederlande gewählt. In Tabelle 4.1 sind ausgewählte Virulenzfaktoren gegenüber gestellt. Für diese Betrachtung wurden ebenfalls nur invasive indische Isolate (34 Isolate) und nicht-invasive Isolates desselben Serotyps (67 Isolate) verwendet. Durch die Verwendung der Protokolle und des von McMillan entwickelten Microarrays konnte eine Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet werden.

Eine Vielzahl der Gene ist bei allen indischen und niederländischen Isolaten präsent, so z. B. das Gen für *collagen-like protein*, *internalin A*, *N-terminal fragment of Sib38 homologue*, Streptolysin S und *mitogenic factor 25K*. Geringe Unterschiede sind in der Distribution der Fibronektinbindungsproteine zu erkennen. Die größten Unterschiede sind in der Distribution von einigen phagenassoziierten Virulenzfaktoren zu erkennen. Die Faktoren *mitogenic factor* (*mf4* und *mf3*), *streptococcal exotoxin speC*, *speK*, *speA*, *speM* und die Phospholipase *sla* sind in den niederländischen Isolaten fast doppelt so oft zu finden. Das Exotoxin *speL* bildet eine Ausnahme, und ist zu 15 % bei den indischen Isolaten präsent, bei den Isolaten aus den Niederlanden nur zu 1 % (Tabelle 4.1).

Die Faktoren GRAB (*protein G-related alpha 2M-bindingprotein*), AmyA (*cyclomaltodextrin glucanotransferase*) und R28 wurden jeweils nur halb so oft bei den indischen Isolaten detektiert.

Dieser Vergleich zeigt, dass es geringfügige regionale Unterschiede des Virulenzgenrepertoires bei Gruppe A Streptokokken gibt. Ein möglicher Grund hierfür könnte die *emm*-Typ Distribution sein. Bei der Studie der niederländischen Streptokokken wurden die Serotypen *emm1*, *emm3*, *emm6*, *emm28* und *emm89* betrachtet, da diese die häufigsten invasiven Serotypen darstellen. In Indien hingegen wurden 31 verschieden Serotypen bei invasiven Erkrankungen isoliert.

Die größten Unterschiede waren in der Verteilung der bakteriophagenassoziierten Virulenzfaktoren zu erkennen. Im nächsten Abschnitt wurden diese Faktoren näher betrachtet und diskutiert.

**Tabelle 4.1: Vergleichende Distributionsanalyse zwischen indischen und niederländischen Isolaten anhand ausgewählter Gene**

Virulenzfaktor	GeneID	Distribution (%)	
		Indien	Niederlande
Adhäsine			
R28	AF091393	98	55
putative collagen binding protein	spyM18_0126	26	37
putative collagen binding protein cpa	SpyM3_0098	28	35
putative collagen-like protein	SpyM3_1702	81	100
laminin-binding protein	SpyM3_1725	97	99
Fibronektin-Bindungsproteine			
prtF15	AF009908	92	76
SfbX	AY120874	86	79
fibronectin-binding protein-like protein A	SpyM3_0652	96	100
PrtF2	U31980	81	63
SfbI	X67947	82	68
SfbII	X83303	15	11
Proteasen			
DRS	AJ300679	22	32
inhibitor of complement-mediated lysis	SPy2016	5	21
streptokinase A precursor	SpyM3_1698	100	100
C5A peptidase precursor	SpyM3_1726	100	100
pyrogenic exotoxin B	SpyM3_1742	100	100
Hämolysine			
CAMP factor	SpyM3_0905	100	92
putative hemolysin III	SpyM3_0815	81	100
andere chromosomal kodierte Faktoren			
protein G-related alpha 2M-bindingprotein	SpyM3_1032	55	99
AmyA cyclomaltodextrin glucanotransferase	SPy1302	25	63
streptococcal protective antigen	spyM18_2046	27	30
Bakteriophagen-kodierte Faktoren			
mitogenic factor (mf4)	SpyM3_1095	3	17
pyrogenic exotoxin C precursor	SPy0711	32	45
exotoxin SpeK	SpyM3_1205	25	42
exotoxin SpeA	SpyM3_1301	26	55
exotoxin SpeL	spyM18_1238	15	1
exotoxin SpeM	spyM18_1239	23	44
streptococcal phospholipase A2	SpyM3_1204	20	42
Deoxyribonuclease mf3	SPy1436	18	45

## 4.4 Distribution von bakterio-phagenkodierten Virulenz-faktoren

Eine Gruppe von bakterio-phagenkodierten Virulenzfaktoren sind die pyrogenen Exotoxine. Diese bakteriellen Superantigene sind potente Immunstimulatoren und werden mit rheumatischem Fieber, Scharlach und toxischem Schock assoziiert (Cunningham, 2000; Smoot, 2002). Es wird angenommen, dass Superantigene eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen (Norrby-Teglund, 2001). Die Distributionsanalysen dieser Faktoren erlaubten neben der *emm* Typisierung die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Virulenzgenen und hervorgerufener Erkrankung (Chatellier, 2000; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003). Darüber hinaus tragen Bakteriophagen zur genetischen Variabilität und Evolution durch den Gentransfer von Virulenzfaktoren von Gruppe A Streptokokken bei (Banks, 2002; Beres, 2002).

Nachfolgend soll deshalb die Distribution von ausgewählten phagenkodierten Virulenzfaktoren der indischen Isolate mit denen von (i) Industrieländern im Allgemeinen, (ii) drei Serotypen aus einer Studie von niederländischen Isolaten und (iii) Isolaten aus Norwegen diskutiert werden. Darüber hinaus wird die Co-Detektionsrate von bakterio-phagenkodierten Virulenzfaktoren in den indischen Isolaten diskutiert.

### 4.4.1 Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokkenisolaten und Isolaten der Industrieländer

Im Verlauf der letzten 25 Jahre wurde ein signifikanter Anstieg von Gruppe A Streptokokken verursachten invasiven Erkrankungen verzeichnet (Stevens, 1989; Johnson, 1992). Zahlreiche Publikationen beschreiben die Distribution dieser Faktoren bzw. die daraus resultierenden Genprofile und Co-Detektionen. In Tabelle 4.2 wurden aktuelle Ergebnisse aus industrialisierten Ländern den in dieser Studie erhaltenen Werten gegenübergestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Virulenzgendiftribution bei den nord- und südindischen Isolaten festgestellt. Wie zu erwarten war, zeigte sich eine hohe Präsenz der chromosomalkodierten Faktoren *speG* und *smeZ* bei den indischen Isolaten sowie bei den Isolaten der Industrieländer. Es traten geringfügige Unterschiede in der Distribution der Faktoren *speH*, *speI*, *speK* und *ssa* auf. Die Präsenz der Faktoren *speA* und *speC*, welche mit invasiven Erkrankungen assoziiert werden, war im Schnitt bei den indischen Isolaten geringer als bei Isolaten der Industrieländer. Das Superantigen *speL* trat, im Vergleich zu den Industrieländern, in Indien mit 15% doppelt so häufig auf. Diese zeigten eine Präsenz des Gens von 5 – 11%. Der Faktor *speM* hingegen wurde bei den indischen Isolaten mit 12% nur halb so oft wie in den industrialisierten Ländern detektiert.

**Tabelle 4.2: Vergleich der Distribution von Superantigenen bei indischen Gruppe A Streptokokkenisolaten und Isolaten der Industrieländer.**

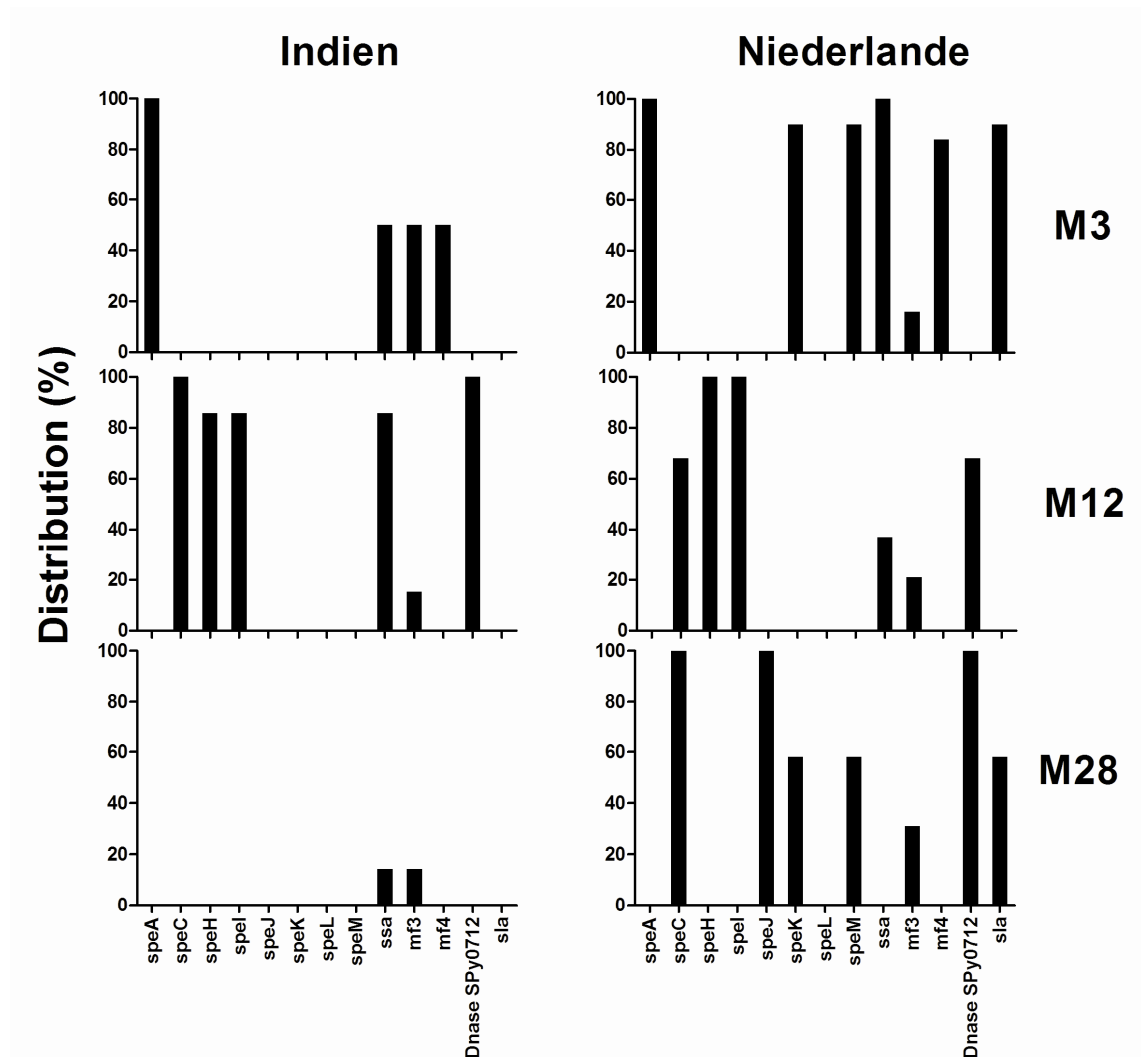
Referenz	Anzahl der Isolate	Region	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>
diese Studie	201	Indien	19	30	90	29	21	27	13	16	12	23	92
diese Studie	65	Chandigarh (Nordindien)	20	37	91	37	30	34	18	18	9	29	86
diese Studie	136	Vellore (Südindien)	19	26	90	25	17	24	10	15	14	21	94
Commons 2008	107	Australien (Melbourne)	35	50	90	19	17	51	9	8	8	22	95
Proft 2003	40	Neuseeland	31	42	100	26	16	100	15	5	/	32	92
Maripuu 2008	92	Schweden	37	61	100	34	29	/	26	11	24	13	/
Meisal 2010	262	Norwegen	26	68	89	29	27	41	19	3	22	20	98
Luca-Harari 2007	278	Dänemark	40	58	99	1	/	/	/	/	/	14	/
Rivera 2006	126	Spanien	31	44	84	23	19	33	/	8	32	28	/
Darenberg 2007 (invasiv)	297	Schweden	/	52	98	16	/	13	/	/	/	30	95
Darenberg 2007 (nicht invasiv)	219	Schweden	/	68	99	17	/	15	/	/	/	24	96
<b>Mittelwert</b>	<b>1421</b>	<b>Industrie-länder</b>	<b>33</b>	<b>55</b>	<b>95</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>42</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>95</b>

#### 4.4.2 Vergleich von phagenassoziierten Virulenzfaktoren der Serotypen M3, M12 und M28 aus Indien und den Niederlanden

In Abbildung 4.3 ist der Vergleich selektierter phagenassoziiierter Virulenzfaktoren der Serotypen M3, M12 und M28 aus Indien und den Niederlanden (McMillan, 2006) dargestellt. Diese Serotypen treten häufig in den Niederlanden auf und wurden in Indien in genügend hoher Anzahl isoliert ( $n > 5$ ), was einen Vergleich ermöglichte.

Beim Serotyp M12 ist die Anzahl der phagenassoziierten Virulenzfaktoren in Indien und den Niederlanden identisch. Es wurden die Gene *speC*, *speH*, *speI*, *ssa*, *mf3* und das Gen Spy0712 (DNase) detektiert. Bei der Distribution dieser waren nur geringe Unterschiede zu erkennen. Eine Ausnahme bildete das Gen *ssa*, welches in Indien mit 85% etwa doppelt so häufig wie bei Isolaten der Niederlande auftrat. Vergleicht man hingegen die Faktoren der Serotypen M3 bzw. M28 der indischen und niederländischen Isolate, erkennt man deutliche Unterschiede in der Anzahl und der Distribution. Bei den

M28 Isolaten aus Indien wurden lediglich die Gene *ssa* und *mf3* mit geringen Distributionsraten (15%) detektiert. Die niederländischen Isolate desselben Serotyps wiesen zahlenmäßig mehr phagenassoziierte Faktoren mit sehr hoher Präsenz auf, wobei die Faktoren *speC*, *speJ* und *SPy0712* zu 100% auftraten. Die indischen Isolate des Serotyps M3 sind durch die Absenz der Gene *sla*, *speK* und *speM* charakterisiert. Bei den niederländischen Isolaten waren diese Gene sehr häufig präsent. Die Gene *ssa*, *mf3* und *mf4* wurden bei 50% der indischen M3 Isolate detektiert und traten nur beim Subtyp *emm3.23* auf. Der Subtyp *emm3.22* war negativ für diese Gene.



**Abbildung 4.3: Vergleich von selektierten phagenassoziierten Virulenzfaktoren der Serotypen M3, M12 und M28 aus Indien und den Niederlanden.** Dargestellt ist ein Vergleich der Häufigkeiten der Gene für Exotoxine, DNasen und der Phospholipase *slaA* zwischen den indischen Isolaten und Isolaten aus den Niederlanden basierend auf der Studie von McMillan *et al.* für die Serotypen M3, M12, und M28.

### 4.4.3 Vergleich der Superantigenprofile indischer und norwegischer Gruppe A Streptokokken

Es wurde gezeigt, dass die hier untersuchten 201 Streptokokkenisolate 63 verschiedene Superantigenprofile besitzen. Jedes dieser Profile ist einzigartig in der Kombination der Superantigene. Vergleicht man die in Indien vorherrschenden Profile mit den in Norwegen beschriebenen Profilen, stellt man Unterschiede fest (Tabelle 4.3). Die in der norwegischen Studie (Maisal, 2010) untersuchten 262 Gruppe A Streptokokken repräsentieren hier die allgemeine *emm*-Typ Distribution der industrialisierten Länder. Es konnten 45 verschiedene Profile identifiziert werden.

**Tabelle 4.3: Vergleich der häufigsten Superantigenprofile indischer und norwegischer Gruppe A Streptokokken (Maisal, 2010).** Die hier betrachteten norwegischen Isolate repräsentieren die Distribution der *emm*-Typen der Industrieländer.

Genprofil Indien	Anzahl Isolate	% Isolate	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Anzahl Gene
1	24	11,94	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
2	16	7,96	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3
3	10	4,98	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3

Genprofil Norwegen	Anzahl Isolate	% Isolate	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Anzahl Gene
1	60	22,9	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	5
2	34	13,0	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	4
3	31	11,8	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	4

Die häufigsten drei Superantigenprofile wurden bei 48% der norwegischen Isolate detektiert und waren durch die Präsenz von 4 bis 5 Genen charakterisiert. Damit besitzen die vorherrschenden indischen Profile weniger phagenassoziierte Virulenzfaktoren als die norwegischen Isolate. Auffällig war, dass das indische Profil 1, welches nur durch die chromosomalkodierten Faktoren *speG* und *smeZ* charakterisiert ist, in Norwegen lediglich bei 8 Isolaten (3,1%) detektiert wurde. Die indischen Genprofile 2 und 3 wurden nur bei 3 Isolaten (1,2%) in Norwegen gefunden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass trotz geringerer Präsenz einzelner Superantigene eine größere Variabilität in der Kombination dieser Faktoren bei indischen Streptokokken anzutreffen war. Die in Indien vorherrschenden Genprofile unterschieden sich stark von denen der industrialisierten Länder, wie hier am Beispiel von Norwegen gezeigt wurde. Die vorherrschenden drei indischen Profile wurden nur bei einer kleinen Anzahl norwegischer Isolate gefunden.



#### 4.4.4 Co-Detektion von Superantigenen

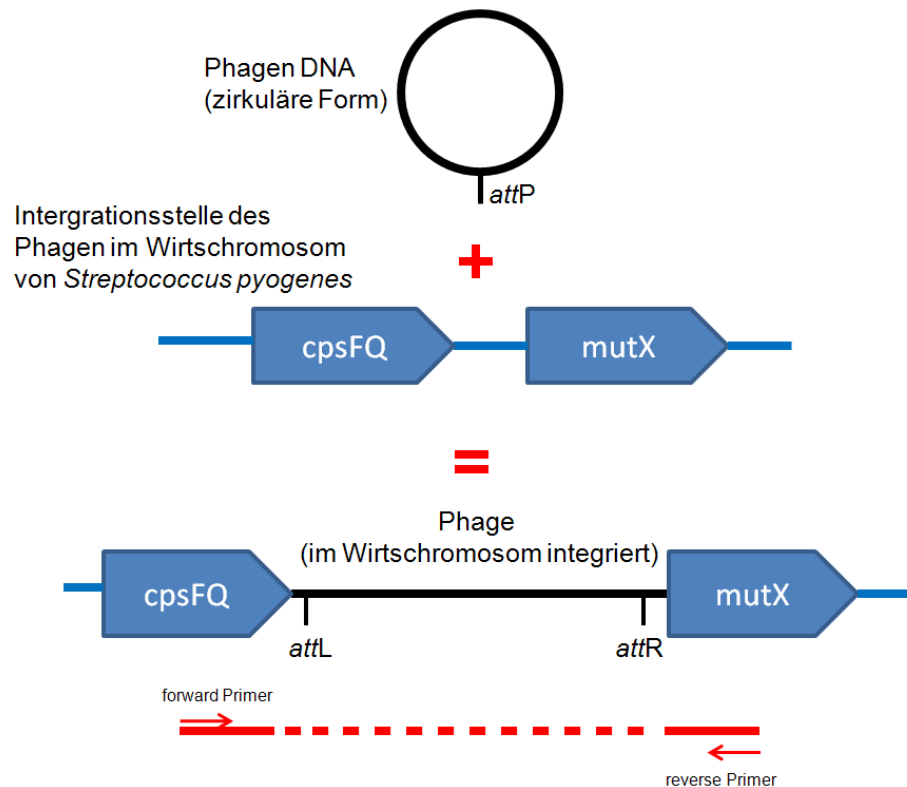
Um bestimmen zu können, ob eine nicht-randomisierte Assoziation zwischen verschiedenen Toxingenen vorlag wurde eine paarweise statistische Analyse vorgenommen und die beobachteten Kombinationsereignisse mit den mathematisch ermittelten Wahrscheinlichkeiten verglichen. Eine Gegenüberstellung dieser Werte ergab, dass einige Genkombinationen häufiger auftraten als die erwarteten Werte vermuten ließen (Tabelle 3.7). Es wurde eine nicht-randomisierte Assoziation der Genkombinationen *speH/I* festgestellt, unabhängig von der Isolationsquelle. Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurden *speL* und *speM* nicht immer co-detektiert (Commons, 2008; Proft, 2003, Igwe, 2003). Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da die beiden Gene in benachbarter Position auf demselben Bakteriophagen ( $\Phi$ *speL/M*) liegen sollten (Smoot, 2002). Bei der Betrachtung aller analysierten Isolate wurde keine signifikante Abhängigkeit beobachtet. Betrachtet man hingegen die Co-Detektion der Faktoren *speL/M* bei Isolaten der Haut, wurde eine signifikante Abhängigkeit festgestellt.

Bei der Analyse der Pharyngitisisolate wurde festgestellt, dass die beobachteten Co-Detektionen von *speA/C*, *speA/ssa* und *speC/J* nicht mit den erwarteten Co-Detektionsraten übereinstimmten (*speA/C* 6%, *speA/ssa* 7%, *speC/J* 6%;  $p < 0,03$ ). Keines der Pharyngitisisolate besaß diese Kombination, es wurde somit eine negative Beeinflussung dieser Faktoren festgestellt.

Diese hier erhaltenen Daten geben nur einen Hinweis auf Unterschiede in der Co-Detektion von Superantigen in Abhängigkeit von der Isolationsquelle. Da nicht zu allen Streptokokkenisolaten detaillierte Daten vorlagen, konnte demnach nur ein Teil der Isolate in die Analyse einbezogen werden. Zur Überprüfung der erhaltenen Resultate werden nähere Informationen zur Isolationsquelle und eine größere Strichprobenanzahl benötigt.

#### 4.5 Prophagen in Gruppe A Streptokokken

Es wurde gezeigt, dass eine große Diversität an Superantigenprofilen bei den indischen Streptokokkenisolaten vorlag. Neben pyrogenen phagenkodierte Superantigenen konnten auch andere nicht-pyrogene Faktoren, wie DNasen und die Phospholipase *SlaA* mit dem Microarray detektiert werden. Des Weiteren war es möglich zahlreiche Gene für hypothetische Phagenproteine, wie Holine und phagenassoziierte Hyaluronidasen, zu detektieren.



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Integration eines Bakteriophagen in das Wirtschromosom von *Streptococcus pyogenes* SF370.** Die Integration findet immer an einer spezifischen Stelle auf der Wirts-DNA statt (hier am Beispiel der Integrationsstelle zwischen den Genen *cpsFQ* und *mutX* dargestellt) und benutzt eine vorgegebene Anheftungsstelle (*attP*) auf dem Phagen. Durch spezifische Primer in Bereichen der Gene, welche neben der Integrationsstelle im Wirtschromosom liegen, kann dieser Bereich amplifiziert werden, solange kein Phage integriert ist. D.h., erhält man ein Amplifikationsprodukt, schließt das einen Phagen aus. Durch die Größe der Phagen DNA von ca. 42,7 kb kann kein Amplifikationsprodukt erhalten werden und indiziert damit das Vorhandensein eines Bakteriophagen.

Bei näherer Betrachtung der Isolate mit den Superantigenprofilen 1, 2 und 6, welche durch die Absenz bakteriophagenkodierter Virulenzfaktoren charakterisiert waren, wurde festgestellt, dass zahlreiche Isolate phagenassoziierte Gene tragen. Die Daten indizieren somit das Vorhandensein unbekannter Bakteriophagen, welche bisher nicht beschrieben wurden. Diese besitzen entweder einen alternativen Aufbau, d.h. eine unterschiedliche Anordnung der Phagenelemente und bisher unbekannte Virulenzfaktoren, bzw. Unterschiede in der Nukleotidsequenz der Phagengene, welche durch die Sonden des Microarrays nicht detektiert werden konnten. Eine mögliche Herangehensweise zur Detektion bisher unbekannter Bakteriophagen wäre die Amplifikation der Bereiche zwischen den spezifischen Integrationsstellen der Phagen im Genom von Gruppe A Streptokokken (Abbildung 4.4).

## 4.6 Natürlich vorkommende Plasmide bei Streptokokken

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmalig eine epidemiologische Übersicht natürlich vorkommender Plasmide bei Gruppe A Streptokokken erstellt. Bisher waren nur wenige Plasmid tragende Serotypen bekannt. Plasmide mit einer Größe von kleiner 5 kb wurden bei den Serotypen *emm3*, *emm28*, *emm92* (Woodbury, 2008) und *emm57* (Heng, 2004) detektiert. Diese kodieren die Faktoren *ermT* bzw. das Bakteriocin Streptococcin A-M57. Über die Präsenz des Bakteriocins Dysgalacticin (Heng, GenBank: AY995189) in spezifischen Serotypen liegen bisher keine Daten vor. Durch das PCR Screening nach Genen für Replikationsproteine konnten 13 Plasmid tragende Serotypen bei den indischen Streptokokkenisolaten identifiziert werden (*emm11*, *emm22*, *emm44*, *emm53*, *emm60*, *emm63*, *emm68*, *emm69*, *emm82*, *emm85*, *emm92*, *emm111* und *st11014*). Das Bakteriocin Dysgalacticin wurde bei 10 Isolaten der Serotypen *emm60.6*, *emm82.1* und *st11014.0* amplifiziert. Bei 9 Isolaten der Serotypen *emm22.8*, *emm69.1* und *emm85* wurde das Gen *Streptococcin A-M57* detektiert. Im Gegensatz zu vorherigen Studien (Heng, 2004) konnte das Gen jedoch nicht bei den drei indischen Isolaten des Serotyps *emm57* amplifiziert werden.

Des Weiteren wurden zwei bisher unbekannte Plasmide identifiziert und vollständig sequenziert. Die Plasmide pA996 und pA852 kodieren neben den Replikationsproteinen bzw. dem Repressorprotein weitere hypothetische sekretierte Proteine. Es konnte für diese keine Homologie zu anderen Proteinen der NCBI Datenbanken festgestellt werden. Die durchgeführten computergestützten Analysen sowie die funktionelle Charakterisierung dieser ORFs gaben lediglich Hinweise, dass es sich bei diesen Faktoren um Bakteriocine handelt.

Eine mögliche experimentelle Methode zur Demonstration eines bakteriocinogenen, inhibitorischen Effekts auf andere Bakterien ist der Wachstumsinhibitions-Assay. Bei diesem Assay kann eine Wachstumsinhibition der (passiven) Indikatorstämme verursacht durch den (aktiven) Teststamm beobachtet werden. Für das Bakteriocin Dysgalacticin wurde damit ein eher eingeschränktes Wirkspektrum gezeigt. Dieses ist hauptsächlich gegen *Streptococcus pyogenes* wirksam (Swe, 2009). Im Gegensatz dazu hat Streptococcin A-M57 keinen inhibitorischen Effekt auf Gruppe A Streptokokken, zeigt aber Aktivitäten bei anderen grampositiven Spezies (Heng, 2004).

In dieser Studie wurde mit Hilfe dieses Wachstumsinhibitions-Assays gezeigt, dass das Isolat A996 einen inhibitorischen Effekt auf andere Gruppe A Streptokokken bzw. Streptokokken der Gruppen C und G, sowie der Oralstreptokokken hat. Bei der rekombinanten Expression im *E. coli* System war es nicht möglich das reife Protein des ORF5 des Plasmids pA996 zu erhalten. Bei der Induktion der Proteinexpression konnte eine toxische Wirkung auf die *E. coli* Kultur beobachtet werden, was sich durch eine drastische Reduktion lebensfähiger Bakterien zeigte. Dies ist ein weiteres Indiz für die bakteriocinogene Wirkung. Ein möglicher Ansatz zur weiterführenden

Charakterisierung dieses plasmidkodierten Proteins wäre die zellfreie Proteinexpression, wie sie mit dem *EasyXpress Protein Synthesis* System von Qiagen möglich ist. Die Erzeugung einer plasmidfreien Mutante bzw. die Transformation des Plasmids pA996 in ein Isolat anderen Serotyps würde zur weiteren Funktionsaufklärung des Plasmids beitragen. Die Transformation in ein anderes Isolat ist jedoch kritisch zu betrachten, da kein Mechanismus bekannt ist, welcher zur Resistenz gegenüber dem potentiellen Bakteriocin befähigt.

Der ORF5 des Plasmids pA996 konnte bei 13 Isolaten detektiert werden. Diese besaßen die Serotypen *emm22.8*, *emm44*, *emm63* und *emm92*. Der ORF3 des Plasmids pA852 wurde bei 26 Isolaten amplifiziert. Diese besaßen die Serotypen *emm11*, *emm53*, *emm63* und *emm68*.

In dieser Studie wurden ausschließlich Streptokokkenisolate aus Indien untersucht. Es wurden bei 13 Serotypen Plasmide detektiert. Acht dieser Serotypen zählen zu den am häufigsten in Indien auftretenden Serotypen (*emm11*, *emm22*, *emm44*, *emm60*, *emm63*, *emm69*, *emm82*, *emm85*). In den Industrieländern zählen lediglich die Serotypen *emm11*, *emm22*, und *emm92* zu den 25 am häufigsten isolierten Serotypen. Ein Vergleich der Präsenz der Plasmide zwischen Industrieländern und Indien würde wichtige Hinweise auf die Funktion bzw. den Vorteil dieser Plasmide geben. So wurde z.B. der plasmidtragende Serotyp *emm11* mit 6,8% am häufigsten in Indien isoliert. Alle Isolate trugen ein Plasmid. In den industrialisierten Ländern trat dieser mit ca. 2,5% auf. Bisher ist nicht bekannt, ob diese Isolate Plasmide tragen. Um die Hypothese, dass das Plasmid einen Selektionsvorteil für diesen Serotyp bewirkt, zu überprüfen, müssten weiterführende Analysen mit Isolaten der Industrieländer folgen. Des Weiteren würde dies Daten für einen Vergleich des epidemiologischen Vorkommens von Plasmiden in Gruppe A Streptokokken liefern.

Das Plasmid pSdyT132 mit dem Bakteriocin Dysgalactacin wurde erstmalig in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Lancefieldgruppe G) beschrieben (Heng, 2006). Um zu untersuchen, ob dieses Bakteriocin auch in indischen Isolaten zu finden ist, wurden 313 Streptokokkenisolate der Gruppen C und G (59 Isolate *Streptococcus anginosus*; 254 Isolate *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) auf die Präsenz von Plasmiden untersucht. Bei *Streptococcus anginosus* konnten keine Plasmide detektiert werden. Bei drei Isolaten von *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* wurden Amplifikationsprodukte für die Gene *repA* bzw. *repB* detektiert. Die Bakteriocine Dysgalactacin und SA-M57 konnten nicht nachgewiesen werden. Bei der Amplifikation der Plasmide stellte sich heraus, dass diese eine Größe von ca. 6200 bp zeigten und somit wesentlich größer waren als die Plasmide der Gruppe A Streptokokken (<5 kb). Vermutlich werden auch bisher unbekannte Faktoren von diesen Plasmiden kodiert. Im Allgemeinen kann aber festgehalten werden, dass Plasmide in Gruppe C und G Streptokokken mit den Genen *repA* und *repB* weniger präsent sind.

Möglicherweise sind die Gene für diese Replikationsproteine weniger stark konserviert und konnten somit nicht mit den verwendeten Primern amplifiziert werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material und Chemikalien

#### 5.1.1 Bakterienstämme

##### **E. coli**

###### **XL1-Blue MRF'**

$\Delta$ (mcrA)183,  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB lacIq Z  $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]; Referenz: (Jerpseth et al.,1992) / Stratagene

###### **M15 (pREP4)**

E. coli mit Repressorplasmid pREP4 (kanR); das den lac-Repressor konstitutiv exprimiert

NalS, StrS, RifS, Lac-, Ara-, Gal-, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+

Referenz: Qiagen, Hilden

###### **TOP10**

F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ -

Referenz: Invitrogen

##### **Gruppe A Streptokokken**

Im Anhang Tabelle 6.3 befindet sich eine Übersicht der verwendeten Gruppe A Streptokokken. Diese wurden im Rahmen des ASSIST-Projektes in Nordindien (Chandigarh) und Südindien (Vellore) isoliert. Zur Überprüfung der Isolate wurde eine Lancefield-Typisierung mit Hilfe eines Agglutinations-Kits durchgeführt. Die Sequenzierung der *emm*-Gene erfolgte in der Abteilung „Genomanalyse“ des HZI.

### 5.1.2 Kulturmedien

Die angegebenen Medien wurden vor Gebrauch im Autoklaven 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

#### 5.1.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen der Streptokokken

Gruppe A Streptokokken wurden zunächst von der Glycerin-Stammkultur auf Blutagarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Aufzucht erfolgte in Flüssigkultur mit Todd-Hewitt-Nährmedium mit 0,5% Hefeextrakt (THY) oder *Tryptic soy broth* (TSB).

##### Blutagarplatten (Merck):

23,0 g Pepton  
5,0 g NaCl  
14,0 g Agar agar  
65 ml Hammelblut  
pH 7,4

##### THY-Medium:

30 g *Todd-Hewitt-Broth*  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

#### 5.1.2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für *E. coli*-Stämme

*E. coli* Bakterien wurden in Luria-Bertani-Medium, unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika, unter Schütteln bei 37°C angezogen. Als Festmedium wurden LB Agarplatten verwendet.

##### LB-Medium: 1000 ml

Trypton 10 g  
NaCl 10 g  
Hefeextrakt 5 g

### 5.1.3 Stammhaltung von Bakterien

Die Aufbewahrung der Bakterien war bei 4°C auf mit Parafilm verschlossenen Agarplatten für einige Tage bis Wochen möglich. Für längerfristige Lagerung wurden Glycerin-Kulturen angefertigt. Bakterien einer Übernachtskultur wurden mit sterilem Glycerin in Kryoröhrchen gemischt, so dass eine Endkonzentration von 20% Glycerin vorlag. Diese wurden bei –80°C eingefroren.

### 5.1.4 Plasmide

**Tabelle 5.1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	Größe (kb)	Selektionsbedingungen	Referenz
pCR2.1	3,9	Amp (50 µg/ml), Km (50 µg/ml)	Invitrogen, 1994
pQE30	3,4	Amp (100 µg/ml)	Qiagen
pGEX-6P-1	4,9	Amp (100 µg/ml)	Amersham

### 5.1.5 Oligonukleotide für die PCR und für Sequenzierungen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Die Konzentration der Primer für die PCR und Sequenzierungsreaktionen betrug 10 pmol/µl. Die Primersequenz wurde so gewählt, dass die Länge der Primer und der Gehalt an GC- bzw. AT-Paaren ein Annealing zwischen 55°C und 65°C ermöglichte.

**Tabelle 5.2 Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Bemerkung
all emmA	TATTCGCTTAGAAAATTAA	Amplifikation <i>emm</i> Gen von GAS
all emmB	GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT	Amplifikation <i>emm</i> Gen von GAS
pemm11_fwd	ATCCAGAATCAATTCCGAATGATTG	Amplifikation Plasmide Serotyp <i>emm11</i>
pemm11_rev	AGTATCTTGCTTTTTCTTTTGCCATA	Amplifikation Plasmide Serotyp <i>emm11</i>
pemm11.2_fwd	AGAGCCTCAAGCGTTTGAGGG	Screening Plasmide Serotyp <i>emm11</i>
pemm11.2_rev	TGATAAGCTTTATATCAGCCTTATC	Screening Plasmide Serotyp <i>emm11</i>
SIC fwd	GATTGGCCTGAAGATGACTGGT	Array Validation
SIC rev	TTACGTTGCTGATGGTGTAT	Array Validation
sla fwd	AATGGAAAATGGCACTGAAAG	Array Validation
sla rev	CTCTAATAGCATCGGCTACGC	Array Validation
SmeZ fwd	CTTCAATATTCATTGCAATAATTTT	Array Validation
SmeZ rev	TGTAAGTGTGTTTTGTTAGTTGAT	Array Validation
SpeA3 fwd	ATGGAAAACAATAAAAAAGRATTG	Array Validation
SpeA3 rev	TTACTTGGTGTGTTAGGTAGACTTC	Array Validation
SpeC fwd	AATTCGATTCTGCCGCTTA	Array Validation
SpeC rev	GCAGGGTAAATTTTCAACGAC	Array Validation
SpeG fwd	TCATGTGTTTTAGCTATGGAAGTC	Array Validation
SpeG rev	ACTGTCTCGACTTAAAAGCTTATCA	Array Validation
SpeH fwd	AGATTGGATATCACAGG	Array Validation
SpeH rev	CTATTCTCTCGTTATTGG	Array Validation
SpeI fwd	AATGAAGGTCCGCCATTTTC	Array Validation
SpeI rev	TCTCTCTGTCACCATGTCCTG	Array Validation
speJ fwd	TTATTTAGTCCAAAGGTAAATATC	Array Validation
speJ_rev	TCATGTGTTTTAGCTATGGAAGTC	Array Validation
SpeK fwd	GGAACATATATGCTCCTAGAT	Array Validation
SpeK rev	GTGTGTCTAATGCCACCGTCT	Array Validation
SpeL fwd	GGAAAAAGAGGGACGCAAG	Array Validation
SpeL rev	CAGCACCTTCCTCTTTCTCG	Array Validation
SpeM fwd	AGTCTGGGACGATGATAA	Array Validation
SpeM rev	GGATGAGTGAATAAATCGGTAAAC	Array Validation



Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Bemerkung
SSA fwd	TCCACAGGTCAGCTTTTACAG	Array Validation
SSA rev	TGATCAAATATTGCTCCAGGTG	Array Validation
DysA fwd	ATTCCAGCGATTCTACCTGCTG	Bacteriocin Dysgalacticin
DysA rev	CTCTCTTGTTACTTCATTACTAGTA	Bacteriocin Dysgalacticin
M57 fwd	CATCTTTTATTACAGCCAAAGTAGT	Bacteriocin SA-M57
M57 rev	TGACCGGCAATTAATGCAGCATT	Bacteriocin SA-M57
plasmid protein fwd	GGG <b>GGATCC</b> AACGAAGTTTGTCAA- CCAGAAACA	<i>Bam</i> HI Schnittstelle; ORF5 Plasmid pA996
plasmid protein rev	GGG <b>GTCGACT</b> TAAATTAGCCATGAA- GCTACAGTTA	<i>Sal</i> I Schnittstelle; ORF5 Plasmid pA996
PP02_fwd	GGG <b>GGATCC</b> ATGACACTAAAAAAGA- CAAAACATATT	<i>Bam</i> HI Schnittstelle; ORF6 Plasmid pA996
PP02_rev	GGG <b>GTCGACT</b> ACTACTGTGACTGTAAC- GTAGCTT	<i>Sal</i> I Schnittstelle; ORF6 Plasmid pA996
repA_fwd	TGATTGAACGTGTTCAATCATGTG	<i>repA</i> (Replikationsprotein für Plasmide)
repA_rev	GTGTTACTTCAACAGAACGAAGATA	<i>repA</i> (Replikationsprotein für Plasmide)
repB_fwd	TCCAGAATCAATCCCGAACGATT	<i>repB</i> (Replikationsprotein für Plasmide)
repB_rev	CTTACCAGCAATCACCTCGTTC	<i>repB</i> (Replikationsprotein für Plasmide)
repA2_fwd	TATATTACTCAAAAAGAGTGGGGT	Amplifikation der GAS Plasmide mit repA rev
repB2_fwd	ACTGGTTTTATGAAGTTGTTGTTTGA	Amplifikation der GAS Plasmide mit repB rev
pA852_P1	TAGCAACCTCTTTAATTGCTATATC	Screening ORF3 auf M11-Plasmiden
pA852_P2	TCACCAACCACAACCTTGCTAAAG	Screening ORF3 auf M11-Plasmiden
pA852_BamHI	GGG <b>GGATCC</b> CAATCAGACAGCCTAG- GCAATTC	<i>Bam</i> HI Schnittstelle; ORF3 Plasmid pA852
pA852_SalI	GGG <b>GTCGACT</b> CACCAACCACAAC- TGCTAAAG	<i>Sal</i> I Schnittstelle; ORF3 Plasmid pA852
repC fwd	CATTAAGATATGACGAAAAGTGGGAA	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repC rev	TTTTTCAAAATTCCAAATTGCCGTAAT	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repD fwd	TGGCAAAAGAACACGCTCAACC	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repD rev	TCTGTGTTTGAATTATGGAGTCGA	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repE fwd	ATGGCAAAAGAAAAAGCAAGATACTT	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repE rev	CCCATACTTTCGCTCTTGATAAAC	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repF fwd	AGAAAAGATGCGTTGGGTTTATCTT	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repF rev	GACTTAACAGAACAGAAAAAAGAGA	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repG fwd	ATGGCAAAAGAAAAATCGAGAAATTTT	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
repG rev	TCAAATATTTCCATTTTCTCTCTCCC	Screening PCR Serotyp <i>emm11</i> GAS
pGEX 3'seq	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sequenzierprimer pGEX
pGEX 5'seq	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sequenzierprimer pGEX
pQE30_fwd	CCTATAAAATAGGCGTATCACGA	Sequenzierprimer pQE
pQE30_rev	AGAGCGTTCACCGACAAACAAC	Sequenzierprimer pQE

## 5.1.6 Reagenzien

### 5.1.6.1 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

**Tabelle 5.3: Restriktionsenzyme mit entsprechender Erkennungssequenz.**

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Erkennungssequenz</b>
<i>AluI</i>	AG/CT
<i>BamHI</i>	G/GATCC
<i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>HindIII</i>	A/AGCTT
<i>XhoI</i>	C/TCGAG
<i>XbaI</i>	T/CTAGA
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC
<i>SmaI</i>	CCC/GGG
<i>SalI</i>	G/TCGAC
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC
<i>HpaI</i>	GTT/AAC
<i>PvuII</i>	CAG/CTG

### 5.1.6.2 Antibiotika

Ampicillin, Sigma

Erythromycin, Sigma

Kanamycin, Serva

Tetracyclin, Serva

### 5.1.6.3 Enzyme für Versuche mit Proteinen

Hyaluronidase, Sigma

Mutanolysin, Sigma

### 5.1.6.4 Molekularbiologische Kits

QIAGEN Kits

QIAGEN DNeasy Tissue Kit

QIAGEN Mini-Plasmid Kit

QIAquick PCR Purification Kit

Invitrogen

BioPrime DNA Labeling System

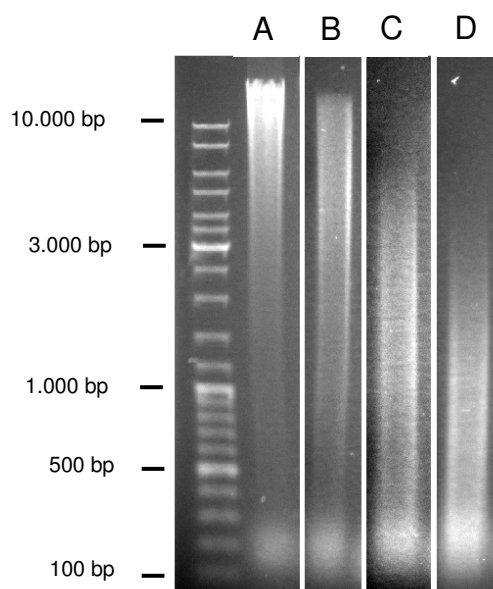
## 5.2 Methoden für die Microarrayanalyse

### 5.2.1 Präparation genomischer DNA aus *Streptococcus pyogenes*

Die Streptokokken wurden in 15 ml THY-Medium über Nacht stehend bei 37°C angezogen. Die Kultur wurde bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 180 µl EB Puffer und 20 µl DNase freier RNase (10 µg/ml; AppliChem) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zirkonium Kügelchen unter Verwendung einer FastPrep. Die weitere Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (DNeasy Blood & Tissue Handbook) und die aufgereinigte DNA bei -20°C gelagert. Die Kontrolle der DNA-Präparation erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

### 5.2.2 Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNA

Für den Restriktionsverdau wurde die TypII Restriktionsendonuklease *AluI* benutzt, da diese durch ihre kurze Erkennungssequenz von n=4 im Durchschnitt nach 4n=256 Basenpaaren schneidet und keine überhängenden Enden hinterlässt. Abbildung 5.1 zeigt, wie durch partiellen enzymatischen Verdau die hochmolekulare genomische DNA auf Fragmentgrößen zwischen 1000 bp und 500 bp eingestellt wurde. Ein Aliquot von 85 µl der genomischen DNA wurde mit 10 µl NEB2-Puffer und 5 µl des Restriktionsenzym *AluI* (1:100 in Enzympuffer verdünnt) vermischt und für 20 bis 45 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Verdaureaktion wurde durch Kühlung in einem Eiswasserbad gestoppt, eine Probe von 3 µl wurde mit 1 µl Ladepuffer vermischt und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um den Fortschritt der Reaktion zu untersuchen. Ein Aliquot von 85 µl der genomischen DNA wurde mit 10 µl NEB2-Puffer und 5 µl des Restriktionsenzym *AluI* (1:100 in Enzympuffer verdünnt) vermischt und für 20 bis 45 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Verdaureaktion wurde durch Kühlung in einem Eiswasserbad gestoppt, eine Probe von 3 µl wurde mit 1 µl Ladepuffer vermischt und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um den Fortschritt der Reaktion zu untersuchen.



**Abbildung 5.1: Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNA.** Die Abbildung zeigt den Fortschritt des enzymatischen Verdau der genomischen DNA des Gruppe A Streptokokkenisolates A981 mit der Restriktionsendonuklease *AluI*. Auf den dargestellten Bildern der elektrophoretischen Auftrennung der Proben im 1%igen Agarosegel erkennt man die genomische DNA nach Präparation (A) und den Verlauf des partiellen Verdau der DNA nach 40 min (B), 80 min (C) und 100 min (D). Als Größenmarker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix von Fermentas verwendet.

Der enzymatische Verdau wurde fortgesetzt und durch stichprobenartige Agarose-Gelelektrophoresen kontrolliert, bis die Fragmentgrößen dem gewünschten Wert zwischen 1000 bp und 500 bp entsprachen. Anschließend wurde das Restriktionsenzym durch Inkubation der Ansätze in einem Heizblock für 20 min bei 80°C deaktiviert. Danach erfolgte die Aufreinigung der partiell verdauten DNA mit dem PCR Purification kit von Qiagen.

#### **Enzympuffer**

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
100 mM KCl  
1 mM DTT  
0,1 mM EDTA  
200 µg/ml BSA  
50% Glycerin  
in dH<sub>2</sub>O

#### **5.2.3 Konzentrationsbestimmung fragmentierter DNA**

Die Konzentration der partiell verdauten und gereinigten genomischen DNA wurde mit einem BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt.

### 5.2.4 Biotinylierung fragmentierter DNA

Die Detektion hybridisierter Gene auf dem Microarray wurde durch die Herstellung biotinylierter Abschriften der fragmentierten genomischen DNA ermöglicht. Hierfür wurde das BioPrime DNA Labeling System (Invitrogen) benutzt. Die Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion ist unten angegeben. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die biotinylierte DNA nach der Reaktion aufgereinigt und dem Hybridisierungsgemisch hinzugefügt.

**Tabelle 5.4: Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion**

Bestandteil	Konzentration	Volumen
partiell verdaute genomische DNA	31,25 ng/μl	24 μl
Random Primers Solution	2,5 ×	20 μl
dNTP Mixture	10 ×	5 μl
Klenow Fragment	40 U/μl	1 μl

### 5.2.5 Erstellung des Hybridisierungsgemisches

Die Hybridisierung der fragmentierten, biotinylierten, gereinigten DNA mit den Sonden des Microarrays erfolgte in einem Puffergemisch, dessen Bestandteile stabilisierend auf die DNA wirkten und unspezifische Interaktionen verminderten. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Fragmente erfolgte in einem Thermocycler (Biometra) für 5 min bei 95°C. Ein Aliquot von 25 μl des Hybridisierungsgemisches wurde für die Hybridisierung eines Microarray eingesetzt.

**Tabelle 5.5: Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches**

Bestandteil	Konzentration	Volumen
fragmentierte biotinylierte gereinigte DNA	~ 15 ng/μl	50 μl
Hybridisierungspuffer	2 ×	125 μl
Acetylated BSA	50 mg/ml	2,5 μl
salmon sperm DNA	10 mg/ml	2,5 μl
ddH <sub>2</sub> O		70 μl

### 5.2.6 Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte in einem SlideBooster™ SB800 (Advalytix) nach den Vorgaben des Herstellers (User Guide SlideBooster™ SB800). Um die Hybridisierung unterschiedlicher Proben zu ermöglichen, wurde jeder der zwei Microarrays eines Slides einzeln mit einem Deckgläschen 22 × 25 mm (IMPLEN) abgedeckt. Unter jedes Deckgläschen wurden 25 μl Hybridisierungsgemisch gegeben. Verwendet wurde ein Programm mit einer Mischintensität von 24 und einer Pulsfrequenz von 3 s Puls und 7 s Pause. Die Hybridisierung wurde bei einer Temperatur von konstant 42°C über einen Zeitraum von 16 h durchgeführt.

### 5.2.7 Färbung und Signaldetektion

Nach der Hybridisierung wurden die biotinylierten DNA-Fragmente durch Fluoreszenzmarkierung mit Streptavidin-Cy5 detektiert. Die dafür notwendigen Abläufe nach der Hybridisierung wurden nach Herstellerangaben (Instructions CodeLink™ Gene Expression System) durchgeführt. Die Färbung erfolgte erneut in dem SlideBooster™ SB800 (Advalytix). Benutzt wurden Deckgläschen der Maße 60 × 25 mm (IMPLEN). Pro Slide wurde ein Aliquot von 50 µl der Färbelösung eingesetzt. Die Färbereaktion erfolgte bei einer Temperatur von konstant 25°C für 30 min mit einer Mischintensität von 27 und einer Pulsfrequenz von 3 s Puls und 7 s Pause. Der Nachweis der markierten DNA-Fragmente wurde durch die Anregung der gebundenen Cy5-Moleküle (649 nm) und die Detektion der emittierten Fluoreszenz (670 nm) ermöglicht. Dies erfolgte mit dem DNA Microarray Scanner G2565CA (Agilent Technologies).

### 5.2.8 Auslesen der Fluoreszenzintensitäten

Die Ergebnisse der Microarrayhybridisierungen lagen nach dem Auslesen der Slides in Form von digitalen Bilddateien (Tagged Image File) vor. Mit Hilfe des Programms ImaGene 5.5 (BioDiscovery) wurde ein Raster über die Bilddatei gelegt, das jedem Spot auf dem Microarray die entsprechende Sondenbezeichnung zuordnete. Die Anpassung von Position, Größe und Form der einzelnen Spots sowie das Auslesen der Signalinformationen wurden von der Software durchgeführt. Spots, die von der gedruckten Kreisform abwichen oder deren Fluoreszenzsignale auf Grund von Kontaminationen nicht ausgelesen werden konnten, wurden manuell als fehlerhaft gekennzeichnet.

### 5.2.9 Datenprozessierung der ausgelesenen Fluoreszenzintensitäten

Die weitere Datenprozessierung wurde mit einem von Dr. Andreas Nerlich entwickelten Algorithmus durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden einer Hintergrundkorrektur mit anschließender log Transformation unterzogen. Nach dem entfernen der manuell markierten fehlerhaften Spots und Berechnung der Mittelwerte für jedes Gen, wurde ein *two component normal mixture model* (McLachlan, 2000) basierend auf einer *maximum likelihood* Methode unter Verwendung des *mclust* Packetes (Fraley and Raftery, 2006) gefitted. Basierend auf diesem Modell konnte anschließend eine Diskriminierungsfunktion bestimmt werden, mit deren Hilfe sich eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines Gens bezüglich seiner Präsenz/Absenz treffen ließ. Diese Werte wurden in einer Matrix gespeichert, wobei vorhandenen Genen der Wert 1 und Genen deren Wahrscheinlichkeitswert auf ein Nichtvorhandensein hindeutete der Wert 0 zugewiesen wurde. Gene die durch die Diskriminierungsfunktion nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden ebenfalls für weitere Analysen als nicht vorhanden eingestuft (Wert 0).

Dendrogramme wurden basierend auf der beschriebenen Matrix der Signalwahrscheinlichkeiten mit Hilfe eines sog. *bayesian agglomerative hierarchical clustering* Algorithmus berechnet (Savage RS, 2009). Alle statistischen Routinen wurden in der R Statistiksoftware Version 2.10.0 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)) und BioConductor Software Version 2.5 (Gentleman, 2004) implementiert.

## 5.3 Molekularbiologische Methoden

### 5.3.1 Polymerasekettenreaktion

#### 5.3.1.1 Standard-PCR

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1988) konnten definierte DNA-Abschnitte mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert werden. Die *in-vitro*-Vervielfältigung dieser Abschnitte wurden im PCR-Thermocycler durchgeführt und beinhalten die Denaturierung der DNA, das Annealing der Primer und die Polymerase-Reaktion (Elongation) in 25 bis 30 Zyklen. Es wurde folgendes PCR Standard-Protokoll verwendet:

#### 1x Master-Mix (25 µl Ansatz):

10 – 100 ng	Template-DNA
2,5 µl	10x PCR-Puffer (Qiagen)
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> 2 mM (Qiagen)
2 µl	dNTPs 2 mM (Fermentas)
1 µl	Primer forward
1 µl	Primer reverse je 10 pmol/µl
13,7 µl	Milli Q
0,3 µl	High Fidelity-Polymerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim) bzw. Taq Polymerase(Qiagen)

#### PCR-Programm:

1.	96°C	4 min	Vor-Denaturierung
2.	94°C	40 sec	Denaturierung
3.	55°C = TA	30 sec	Annealing
4.	72°C	1 min 30 sec = tE	Elongation
5.	72°C	5 min	Endpolymerisation
6.	4°C	∞	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30mal wiederholt.

TA = Annealing-Temperatur, primerspezifisch; lag 5 – 10°C unterhalb der theoretischen Schmelztemperatur  $T_M$  der verwendeten Primer

tE = Elongationsdauer, abhängig von der Prozessivität der Polymerase; für verwendete Taq DNA-Polymerase (Qiagen) bzw. High Fidelity-Polymerase (Boehringer Mannheim) ca. 1 kb pro Minute.



### 5.3.1.2 Colony-PCR

Zur Analyse von *E. coli* Transformanden wurde die Methode der Colony-PCR angewendet. Hierfür wurden 13 µl Milli Q in PCR-Tubes vorgelegt. Mit sterilen Zahnstochern wurden Kolonien gepickt und in diesem resuspendiert. Ein Aufkochen der Bakterien für 10 min bei 96°C bewirkt das Aufplatzen der Zellen und setzt die DNA frei. Zu diesen Ansätzen wurden 7 µl des folgenden Mastermixes gegeben:

#### Mastermix 1x:

2 µl dNTPs 2mM  
2 ml MgCl<sub>2</sub> 2 mM  
2 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen)  
0,4 µl forward Primer  
0,4 µl reverse Primer je 10 pmol/µl  
0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; Qiagen)

Zur Amplifikation der DNA-Fragmente wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

#### PCR-Programm: (Zyklus 30x)

94°C	4 min
94°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	1 min 30 sec
72°C	5 min
4°C	∞

5 µl des PCR-Ansatz wurden mit 1 µl Loading Dye auf ein Agarose-Gel auftragen.

### 5.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA-Molekülen. Abhängig von der Größe der Moleküle wurden 0,8 – 1,0 %ige Gele verwendet. Als Elektrodenpuffer diente 1×TAE. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte bei 100 – 130 Volt in einer Minigelkammer (Horizon<sup>TM</sup>58). Als Größenmarker diente der GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (Fermentas). Zur Analyse der aufgetrennten DNA wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml in dH<sub>2</sub>O) gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Belichtung bei 260 nm mit einer Kodak IS2000R Geldokumentationsanlage.

### 5.3.3 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem präparativen Agarosegel erfolgte mit dem DNA-Gelextraction Kit von Qiagen nach den Protokollangaben des Herstellers. Nach der Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel bei 100 Volt wurde die DNA nach Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die Gelbereiche mit den gewünschten Fragmenten aus dem Agarosegel geschnitten. Entsprechend dem Gewicht des Gelstückes wurde zum Schmelzen der Agarose 3 Massevolumen Schmelzlösung zugegeben und bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen von Qiagen. Zur Elution der DNA von der Säule wurden zwischen 10 und 20 µl EB verwendet. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Konzentration im Agarosegel.

### 5.3.4 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Nach Überprüfung der Polymerasekettenreaktion mittels Agarosegelelektrophorese, erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### 5.3.5 Plasmidisolierung

Die *E. coli* - Stämme wurden in 10 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C schüttelnd (120 rpm) über Nacht angezogen. Zur Isolation der Plasmide aus dem erhaltenen Bakterienpellet wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

Zur Plasmidisolierung aus Gruppe A Streptokokken wurde ebenfalls das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Es wurden 7 ml einer THY Übernachtskultur verwendet. Zum Aufschluss der Bakterien wurden zum P1 Puffer des Kits Lysozym (20 mg/ml) und Mutanolysin hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 5.3.6 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) in entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die 50 µl Restriktionsansätze wurden für mindestens drei Stunden, optional über Nacht, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden diese mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

**Standard Restriktionsansatz:**

1 – 10 µg	DNA
5 µl	10x Restriktions-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease I (20 U/µl)
1 µl	Restriktionsendonuklease II (20 U/µl)
5 µl	BSA (wenn für entsprechende Restriktionsendonuklease erforderlich)
add 50 µl	Milli Q

**5.3.7 Ligation von Nukleinsäuren**

Bei der Ligation kommt es zu einer enzymatischen, ATP-abhängigen Phosphodiester-Bindung zwischen der freien 3'-Hydroxylgruppe und der freien 5'-Phosphatgruppe zweier Doppelstrang-Nukleinsäuren. Diese Reaktion erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym ist in der Lage, entsprechend geschnittene DNA-Fragmente kovalent miteinander zu verknüpfen, so dass ein durchgehender DNA-Doppelstrang entsteht.

Die Ligation des geschnittenen Vektors und des DNA-Inserts erfolgte über Nacht bei 17°C im Thermocycler.

**Ligationsansatz:**

200 ng	geschnittener Vektor
1-2 µg	geschnittenes Insert
1 µl	10x T4-Ligasepuffer (New England Biolabs)
0,4 ml	T4-DNA-Ligase (400 U/µl) (New England Biolabs)
ad 10 µl	Milli Q

## 5.4 Biochemische Methoden

### 5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)

Die Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld ist abhängig von ihrem Molekulargewicht und von ihrer Nettoladung. Bei der denaturierenden SDS-PAGE erfolgt eine Reduktion der Disulfidbrücken an Sulfhydrylgruppen der Proteine. Dadurch verlieren sie ihre Quartärstruktur und werden entsprechend ihrer Untereinheiten aufgetrennt. Durch Zugabe von negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS), das sich an hydrophobe Regionen der Proteine anlagert, werden die Gesamtladungen überdeckt und der Ladungseinfluss auf die Elektrophorese neutralisiert. Somit ist die Retention im Gel abhängig von der Größe des Moleküls und damit proportional zur relativen Molekülmasse.

Die Proteinproben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 bis 10 min bei 96°C aufgeköcht und auf ein Gel aufgetragen. Die Fokussierung der Proteine erfolgte in einem 4%igen Sammelgel. Die Auftrennung erfolgte in einem 8 bis 12%igen Trenngel. Die Elektrophorese wurde in 1×SDS-Laufpuffer bei 200 V durchgeführt. Als Größenmarker dienten der PageRuler™ Protein Ladder bzw. der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix (Fermentas). Es wurde das MiniProtean 3- System von BIORAD verwendet.

### 5.4.2. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie R-250 Brilliant Blue gefärbt. Dazu wurde das Gel kurz in der Mikrowelle mit Coomassie-Färbelösung aufgeköcht, alternativ erfolgte die Inkubation über Nacht unter Schütteln mit der Färbelösung. Die Entfärbung erfolgte für 2-3 Stunden in Entfärbelösung oder alternativ durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle mit ddH<sub>2</sub>O. Das erhaltene Bandenmuster wurde durch Einscannen dokumentiert.

### 5.4.3 Proteindialyse

Um Proteine in andere Puffer zu überführen, wurde eine Dialyse gegen den entsprechenden Puffer durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden in einen äquilibrierten Dialyseschlauch mit entsprechend gewählter molekularer Trenngrenze überführt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren in 2 l des gewünschten Puffers dialysiert. Für das Umpuffern kleinerer Proteinmengen (500 µl bis 3 ml) erfolgte die Dialyse in Slide-A-Lyzer Kassetten mit entsprechend gewählter molekularer Trenngrenze.

#### **5.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976)**

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung. Diese basiert auf einer Farbveränderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, der an basische und aromatische Aminosäuren bindet. Zur Bradford-Bestimmung wurden von jeder Probe Dreifachbestimmungen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Standard zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt. Es wurden jeweils 10 µl der BSA-Lösungen bzw. der zu bestimmenden Probe mit 200 µl Bradford-Reagenz (zuvor 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Intensität des Farbumschlages der Bradford-Reagenz bei 595 nm photometrisch im ELISA-Reader (Tecan Sunrise) vermessen und die Proteinkonzentration durch Abgleich mit den Messwerten der Kalibriergeraden bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden parallel mittels SDS-PAGE kontrolliert.

## 5.5 Expression von rekombinanten Fusionsproteinen in *E. coli*

### 5.5.1 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* unter Verwendung von TSS-Puffer und Transformation

Die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* erfolgte nach der Methode von Chung *et al.*, 1989. Hierbei wurde eine Kultur *E. coli* 1:20 in TSS-Medium angeimpft und bis zu einer OD von 0,3 bei 600nm angezogen. Nachdem die Kultur für 10 min auf 4°C abgekühlt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rpm. Das Bakterienpellet wurde in 1/10 TSS-Medium des Ausgangsvolumens der Kultur resuspendiert und zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### TSS-Medium:

Hefeextrakt	1,25 g
Bacto Trypton	2,5 g
NaCl	1,25
PEG 3000	25 g (Polyethylenglycol)
Mit Wasser auf 225 ml auffüllen; autoklavieren	

#### Vor Gebrauch zusetzen:

12,5 ml DMSO

12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> (autoklaviert)

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen mit 10 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dies bewirkt eine Anlagerung des Vektors an die Zellmembran. Die Aufnahme dieses wird nach dem Hitzeschock für 3 min bei 43°C erleichtert. Die Temperaturdifferenz bewirkt die Bildung von Poren in der Bakterienmembran und ermöglicht somit die Aufnahme des Vektors. Nach der Inkubation für 60 min bei 37°C in 1 ml LB-Medium unter Schütteln erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Danach wurden 150 bzw. 50 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37°C über Nacht zur phänotypischen Expression inkubiert. Die Überprüfung der Transformation erfolgte mittels Colony-PCR.

### 5.5.2 Überexpression rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli*

Nach entsprechender Colony-PCR-Analyse wurden positive *E. coli* Transformanten zunächst im Rahmen einer *small scale*-Expression getestet. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versehen und über Nacht, schüttelnd bei 37°C angezogen. 1 ml dieser Vorkultur wurde zu 2 ml frischem Antibiotika-Medium gegeben, welches 1mM IPTG enthielt. Als Negativkontrolle (nicht-induzierte Kultur) wurde 1 ml der Vorkultur zentrifugiert und das Bakterienpellet in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 96°C aufgekocht. Von der induzierten Kultur wurde nach 4 h Wachstum bzw. Inkubation über Nacht ebenfalls 1 ml entnommen, zentrifugiert und das Pellet in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach 5 min Aufkochen wurden die Proben auf einem entsprechend gewählten SDS-Gel analysiert bzw. bei –20°C gelagert.

Für eine Proteinproduktion in großem Maßstab (*large scale*) wurden 250 ml vorgewärmtes Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C (schüttelnd, im Schikanekolben) bis eine OD von 0,6 – 0,7 bei 600 nm erreicht wurde. Zu dieser Kultur wurden nochmals 250 ml Medium mit den entsprechenden Antibiotika gegeben, welches IPTG enthielt, so dass eine Endkonzentration von 1 mM vorlag. Die Inkubation erfolgte schüttelnd über Nacht bzw. für 4 h bei 30°C. Die Bakterien wurden durch 10 min Zentrifugation mit 10'000 rpm bei 4°C (Rotor SLA-3000; RC5C-Zentrifuge; Sorvall) geerntet. Das Pellet wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 5 ml PBS resuspendiert. Zu den resuspendierten Bakterien wurde der Proteaseinhibitor PMSF mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben.

### 5.5.3 Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Zur Lyse der erhaltenen Bakteriensuspension wurde eine French-Press (40 K Zelle; 1000 psi) benutzt. Das durch Zentrifugation (30 min bei 20'000 rpm; 4°C; SS-34 Rotor) erhaltene Lysat wurde zu 3 ml Bettvolumen Glutathion-Sepharose (Glutathion Sepharose 4 Fast Flow; Amersham) bzw. Ni-NTA Sepharose gegeben. Die Kopplung der rekombinanten Fusionsproteine an die Matrix erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rollinkubator. Nach Zentrifugation bei 500 x g, wurde das Sepharosebett 5mal mit dem 2-3fachen Bettvolumen mit PBS gewaschen.

Die Elution der GST-Proteine erfolgte mit 2 x 3 ml Elutionspuffer. Die Inkubationszeit des Elutionspuffers betrug 10 bis 15 min. Über Nacht erfolgte eine Dialyse gegen PBS. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Proteinelution im 12%igen SDS-Gel und eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford. Die Proteine wurden bei –20°C gelagert.

### 5.5.4 Induktion der Überexpression des durch ORF5 kodierten reifen Proteins des Plasmid pA996

Für diesen Versuch wurden 50 ml LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,05 in einem Schikanekolben angeimpft (Zeitpunkt 0 min). Die Inkubation erfolgte schüttelnd (140 rpm) bei 37°C. Bei Erreichen der  $OD_{600nm}$  von 0,6 wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert (final 0,1 M). Ab Zeitpunkt 0 min bis 330 min wurden im Abstand von 30 min die  $OD_{600nm}$  gemessen und die CFU/ml durch Plattierung auf LB Platten mit den entsprechenden Antibiotika bestimmt.

## 5.6 Methoden für Versuche mit $^{125}I$ markierten Proteinen

### 5.6.1 Markierung von Proteinen mit $^{125}I$ Iod

Die Proteine wurden nach der von Hunter und Greenwood (1962) beschriebenen Chloramin T Methode, mit  $^{125}I$  radioaktiv markiert. Bei der Chloramin-T-Methode werden Tyrosin-Reste eines Proteins jodiert. Das in wässriger Lösung zu Hypochlorsäure zersetzte Chloramin T oxidiert  $^{125}I^-$  zu  $^{125}I^+$ .  $^{125}I^+$  setzt die anionische Form des Tyrosins zu  $^{125}I$ -Tyrosin um.

Zur radioaktiven Markierung von Kollagen IV mit dem Isotop  $^{125}I$  wurden 100 µg Protein in 0,1 M NaAc in silikonisierte Glasröhrchen gegeben. Um den pH-Wert zu neutralisieren, wurden 100 µl des gelösten Kollagenes vor der Iodierung 1:1 mit PB Puffer gemischt.

Nach Zugabe von 2,5 µl  $^{125}I$  (~ 0,25 mCi) wurde mit 20 µl frisch gelöstem Chloramin T (1 mg/ml in Phosphatpuffer) die Oxidationsreaktion gestartet. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 20 µl Na-Metabisulfid (1 mg/ml) gestoppt. Nach Auffüllen des Reaktionsansatzes mit PBST auf 2,5 ml wurde dieser zum Entfernen ungebundener Radioaktivität über eine PD-10 Gelfiltrationssäule gegeben. Das radioaktiv markierte Protein wurde mit 3,5 ml PBST eluiert.

#### Puffer für die Iodierung

PB Puffer pH 7,5

Stock A: 0,2 M $NaH_2PO_4$	80 ml
Stock B: 0,2 M $Na_2HPO_4$	420 ml
ad $dH_2O$	1000 ml



### 5.6.2 Bindungsversuche mit $^{125}\text{I}$ -Collagen IV

Für die Bindungsversuche wurden 50 ml einer TSB-Übernachtskultur 8 min bei  $3500 \times g$  zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 20 ml PBST resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  PBST aufgenommen und die Suspension bei 600 nm auf 10% Transmission eingestellt. Eine Transmission von 10 % entspricht in etwa  $1 \times 10^9$  Bakterien je ml. 250  $\mu\text{l}$  dieser Suspension mit etwa  $2,5 \times 10^8$  Bakterien wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 14 ng (0,001 mCi) des radioaktiven Proteins gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und zur Entfernung von ungebundenem radioaktiv markiertem Protein mit PBST gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde nach Abnehmen des Überstandes die vom Pellet emittierte radioaktive Strahlung im Gamma-Zähler (Wallac) gemessen. Der Versuch wurde im dreifach Ansatz durchgeführt. Für die 100%-Werte wurde die gleiche Menge an radioaktiv markiertem Kollagen IV eingesetzt. Dieses wurde mit 20  $\mu\text{l}$  FCS versetzt und mit Trichloressigsäure gefällt. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde die vom Pellet emittierte radioaktive Strahlung bestimmt. Die prozentuale Bindungsaktivität an radioaktiv markiertem Protein wurde durch den Vergleich mit der gesamten im Versuch eingesetzten, radioaktiv markierten Proteinmenge ermittelt (100% Wert).

### 5.6.3 Dot-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der Liganden-Rezeptor-Interaktion unter nativen Bedingungen wurden aufgereinigten Zielproteine (rekombinante GST-Fusionsproteine bzw. Proteine ohne GST) auf eine Nitrocellulose-Membran (BioRad) in unterschiedlichen Konzentrationen (5  $\mu\text{g}$ ; 1  $\mu\text{g}$  und 0,1  $\mu\text{g}$ ) appliziert. Nach dem Absorbieren der Proteine an der Membran wurde diese getrocknet und anschließend mit 5% Magermilch (w/w) in PBS für 1 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS wurde der Blot für 20 min mit 25  $\mu\text{g}$  radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -Kollagen IV inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 20 min mit PBST gewaschen und die Bindung mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert. Der Film wurde entwickelt und durch einscannen dokumentiert.

## 5.7 Puffer und Lösungen, soweit nicht in Methoden beschrieben

**PBS:** 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH7,4

**PBST:** PBS mit 0,05 % Tween 20

### 10 × TAE-Puffer

Tris-Base	400 mM
EDTA	10 mM
dH <sub>2</sub> O	600 ml

pH-Wert mit Eisessig 8,0 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

### DNA-Probenpuffer für Agarosegele (6×)

Bromphenolblau (w/v)	0,25 %
Xylencyanol (w/v)	0,25 %
Glycerin (v/v)	30 %

In 1 × TAE Puffer lösen

### SDS-Laufpuffer (10×)

Tris-Base	30 g
SDS	10 g
Glycin	144 g
ddH <sub>2</sub> O	1000 ml

### SDS-Probenpuffer (1×)

Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
SDS (w/v)	2 %
Bromphenolblau (w/v)	0,001 %
β-Mercaptoethanol (v/v)	5 %
Glycerin (v/v)	10 %

In dH<sub>2</sub>O; β-Mercaptoethanol wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben

### Trenngelpuffer

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
-----------------	-------

### Sammelgelpuffer

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
-----------------	-------

**Tabelle 5.6: Polyacrylamidgele**

Prozent	ddH <sub>2</sub> O (ml)	30 % Acrylamid/Bis (ml)	Gel Puffer* (ml)	10 % w/v SDS (ml)
4	6,1	1,3	2,5	0,1
5	5,7	1,7	2,5	0,1
6	5,4	2,0	2,5	0,1
7	5,1	2,3	2,5	0,1
8	4,7	2,7	2,5	0,1
9	4,4	3,0	2,5	0,1
10	4,1	3,3	2,5	0,1
11	3,7	3,7	2,5	0,1
12	3,4	4,0	2,5	0,1
13	3,1	4,3	2,5	0,1
14	2,7	4,7	2,5	0,1
15	2,4	5,0	2,5	0,1
16	2,1	5,3	2,5	0,1
17	1,7	5,7	2,5	0,1

\* Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
Sammelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Direkt vor dem Gießen des Gels wurden für 10 ml monomerer Lösung Sammelgel bzw. Trenngel: 50µl 10% APS und 5 µl TEMED zugefügt.

#### Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue (w/v)	0,1%
Methanol (v/v)	40%
Eisessig (v/v)	10%

#### Entfärbelösung

Methanol (v/v)	40%
Eisessig (v/v)	10%

## 6 Anhang

### 6.1 *Streptococcus pyogenes* Plasmid pA852

**Größe:** 2644 bp

**Quelle:** *Streptococcus pyogenes*  
Isolat A852  
Serotyp *emm11.0*

**ORF1** Bezeichnung: *copG*  
Start: 2495                      Ende: 2632  
Bemerkung: *copy control protein*;  
Translation:

“MKKRLTITLSESVLGNLEKMAKEMGLSKSAMISVALEDYKKGQVK”

**ORF2** Bezeichnung: *repB2*  
Start: 48                              Ende: 680  
Bemerkung: *replication initiation protein*;  
Translation:

”MAKEKARYFTFLLYPESIPNDWELKLETLGVPVIAVSPLHDRDKSNVEGQKYKK  
SHYHVIIYIAKNPVTADSVRKKIKLLLGEKSLAMVQVVLNVENTYLYLTHESKD  
AIAKKKHVYDKADIKLINNFDIDRYVTLDVEEKAELFNVVVSLIRAYTLQNIFDL  
YDFIDENGETYGLTINLVNEVISGKTGFMKLLFDGAYQRSRRGEINRGK”

**ORF3:** Bezeichnung:  
Start: 947                              Ende: 1255 (komplementärer Strang)  
Bemerkung: unbekanntes hypothetisches Protein, Signalpeptidsequenz  
Translation:  
“MKKKKIYSFLATSLIAISTSMTFSTSTVYAQSDSLGNSPADAIIDKIYRNLS PQE  
KRRIDQARANNAKCLAKAGISAVGAYATGGSASAASAFLTTLASCGW”

#### Replikationsursprung

Bezeichnung: *sso*

Start: 1763                              Ende: 1936

Bemerkung: *single-strand* Replikationsursprung vom Typ *ssoA*

Bezeichnung: *dso*

Start: 2260

Ende: 2357

Bemerkung: *double-strand* Replikationsursprung; pLS1/pMV158 *rolling-circle* Plasmidfamilie

### Plasmidsequenz:

```

1  ggcaggcggg ctttttagata tattataact tggggatatt atactttatg gctaagaaga
61 aagcaagata cttcactttt ttgctctatc cagaatcaat tccgaatgat tgggaattga
121 agcttgaaac tcttgaggtt ccgatagcgg ttagtccgct tcatgataga gacaagagta
181 atgttgaggg acagaaatat aaaaaatctc actatcatgt gatztatatt gctaaaaacc
241 cagttactgc agatagtgtt cgtaagaaaa ttaagttgtt acttgagaa aagagtttag
301 caatggtgca agttgtttta aacggtgaaa atacatactt gtatttgact catgagagca
361 aagatgcaat tgctaagaaa aagcatgttt atgataaggc tgatataaag cttatcaata
421 acttcgatat cgaccgctat gtgacgttag atgtggaaga aaaagcagaa cttttcaacg
481 tggtagattt tcttattcgt gcatatactc ttcagaatat ttctgatttg tatgatttta
541 ttgatgaaaa tggagagact tatggattaa ctataaattt ggtaaagcaa gttatttcag
601 gaaaaactgg ttttatgaaa ttgttgtttg atggagctta tcagcgttct agacgtgggtg
661 aaattaatag gggtaaataa gtttttagttt tgataattta aataggcaag tagttaaaat
721 tttatataaa gatatatgtt tatggggtgt aaaaatgagt aaattgttaa gacttttagt
781 tcaatcattg atttttttat tattactttt tgttatagaa aaaataaatt tgaatgaact
841 gttcagatat gtatctatat tttttgcagc acttattgtg ttcaataaaa aatggtttag
901 taaataaaaa atagcgtata tacgctattt tttatttact aaacgttcac caaccacaac
961 ttgctaaagt agttaagaat gcacttgctg cgctcgctga ccctccagta gcgtaagcac
1021 caactgcaga aattccagct ttagctaaac atttagcatt atttgctctg gcttgatcta
1081 ttcttctttt ttcttgagga cttaaatttc tatatatctt atctattatt gcgtcggcgg
1141 gtgaattgcc taggctgtct gattgagcgt aaacggttga ggtgctgaaa gtcatagagg
1201 tagatatagc aattaaagag gttgctaaaa aactataaat ttttttcttt ttcataaaat
1261 atctcctgat aatctaaagg tattgaaagt gtatgttgag gaattttata gtttctattt
1321 tctcctttct agttaaattt ttgaatgcgc tttcatttta tcattaaaaa tattttttgt
1381 caaaacattt ttaggatttc attaaaattt taaaattatt tcaggcaggc aacgggtttg
1441 tgtacacaaa ccccaaaaaa cagtgttttt gtcttggttg gattctccta aaaccataat
1501 aaaaaagatc agtattattt aaaaatgctg gtcttttttt aatgtcattg cattcgattt
1561 tttactcact agtattcgta tgattttatt tttagtcgag cgtagcgaca aattcagatg
1621 acatcatctg aataaggttt caggcactct aataagccgt ttaagcgatt tgtccgcaca
1681 aatccggttg ttgcctgaat cagatttgta aatgccttaa aacgcaaata tgagccttct
1741 gagaggtttt agagataatc taagcgattt atgccgtgaa agctccttga cgataagcag
1801 ggacaaggta gacttagctg gggcggtttt gtcagaactt tgttcgaccg accggcaaag
1861 caagtatcgc cgtccctggt ttcttgctgt caaggagacc atggaataaa gtaagcgtgc
1921 atgatataat aaccaagtgc cattcactaa acagcgaaa gttggagggtg aaactttatg
1981 ctaaaagtat ttcttgaact tgttttgcta ccgctgacag tcagtgtagt tgcagaacta
2041 attgcggaat ggttaatccg tatgtggcaa aacaaaggcg acaataaact taacttgagc
2101 accttgagca agtgcaataa aaaataccta ggttgcccc taggtatttt ctttatgctt
2161 atatttcctg aacttttaag caccttcatt gtatcacgtg tgagataatg tgtcaaaaat
2221 tgggttggtt ggaggaattt tgagggggtt ttctggttag aaaaatccaga atatgggggg
2281 ctactacgac ccccatata gtgccgagtg ccaaattcga aaaaaagtg ggttgaagct
2341 tagagcctca agcgtttgag ggtgtttaa cctcggcgac ttttcggcga ctttttagcg
2401 actttttgat aattttttag aaatagtacg aagaaagttg catttaatgc gtagttttgc
2461 taatatgaac ttataaaatt ttgagaggtg acttatgaaa aaaagattaa cgataacgct
2521 cagtgaatct gtacttgga atcttgaaaa aatggcgaaa gagatgggtt tatcaaaatc
2581 tgcaatgatt tcagttgcct tagaagatta caagaaaggt caagtaaaat aaaaaagccg
2641 agct

```

## 6.2 *Streptococcus pyogenes* Plasmid pA996

**Größe:** 3620 bp

**Quelle:** *Streptococcus pyogenes*

Isolat A996

Serotyp *emm44.0*

**ORF1** Bezeichnung:

Start: 1746                      Ende: 1994

Bemerkung: 98% Homologie zum hypothetischen Proteine pSdyT132p4

Translation:

“MENIVPVSDMRYYNQTLSDVSVGSQVILTRNGKAEYAVVDIEEWRRTKATL  
RLFEELQKGYRSLANEKTYTPDELAERLGVD ”

**ORF2** Bezeichnung:

Start: 1994                      Ende: 2311

Bemerkung: 97% Homologie zum hypothetischen Proteine pSdyT132p5

Translation:

„MSYKVITSSETVRDIEEAVFYKEGLGVYPENNVKFKKAVVSTIRKLVDSPKIG  
ANLSARIDEETEIKYSVIDDYILFYEIEADTVKVLRLLLPAKTNWVNTILKYL”

**ORF3: Bezeichnung: *repA***

Start: 2624                      Ende: 3566

Bemerkung: *replikation initiation protein*

Translation:

„MVNELNQEEVLRDKNSKGGKDRDWRGRKIMSLKLADVFNELGYKKSMIERV  
QSCGEVLNFIHSDGSLKLYQAYFCKNKLCPMCNWRRSMKYSYQTSRIVDEA  
IKRESKGRFLFLTLTVKNVPGSDLNKTLSLTSQSFDRFLFRRRAKVKKNLIGYLRS  
VEVTHNELTNEYHPHIHVLLMLKISYFKGGNYITQKEWGEMWSQSLKVDYVP  
MIDIRAVKEKGKGLKGAILETAKYPTKPIKLEMENKQVDDLYNGLYRKRQL  
GYGGLFKIIKKELALDDAENGDLIHTSEDNDSLSEGTKIVAIWNAIKQNYYLK”

**ORF4:** Bezeichnung:

Start: 9                              Ende: 314

Bemerkung: unbekanntes hypothetisches Protein

Translation:

„MAQINIRVTDEQKALINKLAKENEKSISAYIIDKICIESVYQNSKRIDETKKD  
DEGLILLMLKQLEQKDMQIEQLHKIIYNKDTKLLEYDSKKSWWQFWK”

**ORF5:** Bezeichnung:

Start: 615                              Ende: 1121

Bemerkung: unbekanntes hypothetisches Protein, Signalpeptidsequenz

Translation:

„MKNKLFKIITTSITIVTLGGVFVPSAIYANEVLQPETVVSLPSDINRDQLTTEIIS  
DIEKEGLPEILNERPKRQKRGAAGLMATLIAKYGVRYVKTQLPKIYKHIGKY  
VGKNKIGEAAFVRIFGNIVDWGTGAAIEQALQAALQAAGIDAGTANTVATVTV  
TVASWLI”

**ORF6:** Bezeichnung:

Start: 1082                      Ende: 1266 (komplementärer Strang)

Bemerkung: unbekanntes hypothetisches Protein

Translation:

„MTLKKT KHIYNMLCLKNTSYLKKKYFISANKAAEIAPYIIYFLFFIFFLKLAMK  
LQLQSQ”

**Replikationsursprung**

Bezeichnung: *sso*

Start: 1527                      Ende: 1624

Bemerkung: *single-strand* Replikationsursprung

Bezeichnung: *dso*

Start: 2406                      Ende: 2439

Bemerkung: *double-strand* Replikationsursprung; pC194/pUB110 Familie  
*der rolling-circle* Plasmide

**Plasmidsequenz:**

```

1  aggaaatttat ggctcaaatt aatataagag ttacagatga gcagaaagcc ttaattaata
61 agcttgctaa agaaaaacgaa aaatctatat cagcgtatat cattgataaa atttgtatag
121 aatctgtata tcaaaatgat agcaaacgta tagatgaaac taaaaaagat gatgaaggat
181 taattttggtt gctgatgaaa caattagaac aaaaagatat gcaaattgaa caactccata
241 aaataatttta caacaaagat actaaacttt tagagtatga ttctaaaaaa agttgggtggc
301 aattttggaa atgaagaata tatttaaaaa agttggaatt atgttccaac ttttttgact
361 aagaaaatta ttatttgaga tagtgcataa agagattaaa cattataatt atgataaacc
421 taggttgggtt ttcttagaat taattatgta gtcaggggta cataattaac ctacaactcc
481 ttaattatag caaaaaaata attataaaaa aagacttgta ttttaaaaaa aatataataa
541 aattaaagcg ttaactagtt aatgctttta ttttatgcag cgtttagttt ttttaagatt
601 tatggagttt ttttatgaaa aataaattat ttaaaattat aactacgtct ttaactattg
661 taacttttag aggtgttttt gttccttctg ctatttatgc taacgaagtt ttgcaaccag
721 aaacagtagt aagtttacca tctgatatta atagagatca attaactact gaaattatat
781 ctgatattga aaaagaaggg ctccctgaga ttctgaatga acgtccgaaa cgccagaaaa
841 ggggagctgc cggtttaatg gcaactctaa ttgctaagta tgggggttaga tatgtaaaaa
901 ctcaacttcc gaagataatt tataaacata ttgggaaata tgtgggaaat aaaattgggtg
961 aagcagcggt tgttaggatt tttggaaata tcgtagattg gggaacagga gctgctatag
1021 aacaagcatt agcccaagca ttacaagctg caggtattga tgctggcaca gctaacacag
1081 ttgctactgt gactgtaact gtagcttcat ggctaattta agaaaaaaa taaaaaagag
1141 aaaatatatt atgtatgggt ctatttctgc agctttatta gcacttataa aatatttttt
1201 ctttaagtaa cttgtatttt taagacaaag catattataa atatgttttg tcttttttag
1261 tgtcattata ttcgattttt ttacttactt agcgttcgta tgattctatt ttgttgttgt
1321 aaattatttc aacaacaaaa tagaatagca atcatttagt cgagcgtagc gacaaattca
1381 gatgacatca tctcaataag gttttagaca ccttaacaag ccgtttaagc gatttgtgta
1441 tacaaatccg ttgcttgccct gaatcagatt gtaaaatggc ttagaaggca aatatgagcc
1501 ttctgagagg ttttagagat aagttaagcg atttatgccg agaaaacttt agtcagtaag
1561 ctgaagcgat ttagacttaa cgtgtctagt cgggaaggctg aaagacgaac gactggatac
1621 gtagtcaaaa aaaatagcga aaggttactt gctgactaaa ggaaattgga ataaagggaag
1681 cggacttgaa gaaaaaacta tcacgtgcta taattaagta aaattttaag taagtaggtg
1741 agactatgga aaacattgta cctgtatcag atatgcgtta ttataatcaa acgctgagtg
1801 atgtgtcggg ttggttctcaa gttattttga ccgtaaacgg gaaagctgaa tatgcggtag
1861 tcgatattga agaattggaga cgtacgaaag caacactacg cttgtttgag gaattgcaaa
1921 agggctatcg ctctctagcg aatgaaaaga cttatactcc agatgagctt gcggaacgac
1981 taggggtgga ctgatgagtt acaaagtgat aacttcgagt gaaacagtc cagatattcga
2041 ggaagctggt ttttacaaag agggctctggg agtttatcca gaaaatgtcg taaaattcaa
2101 gaaagctgtc gtttcaacta tccgaaagtt agtggattca cccaagattg gagctaattt
2161 gtacgcaaga attgacgaag aaaccgagat taaatatagt gtgattgatg actatatcct
2221 gttttacgaa attgaagctg ataccgttaa ggtattgcga ttgttgccgg ctaaaaactaa
2281 ctgggttaat acgattctga aatacctgtg atataaaaaa gacctgttaa gggctctttt
2341 tgggtgaatt ttgaacgaag tgaaaaaaag agggctggga agcccttaga aaccctcgaa
2401 gaggtgttct tcttatcttg atacttttag aaataactct catgctaaaa agagtctctc
2461 taccataatt aaacccttgg tattattgga ttttttagcac aaaaaaaagc ttgattctca
2521 gtcaaaactt tgatatgatt tagtcaccac aacaaaaaca tagaaagaga gatgagtaca
2581 aacttttttt gtgaattaat tcttttttgt actccaatta taacatggta aatgaactaa
2641 atcaagagga agttcttaga gataaaaaaca gtaaaggtaa ggatagagat tggcgaggtc
2701 gcaaaatcat gagcttgaaa ttagctgatg tctttgagaa tttagggtat aaaaaatcaa
2761 tgattgaacg tgttcaatca tgtggtgaag ttttaaaact tattcgctat tcagacgggt
2821 ctttaaaatt atatcaagct tatctctgta agaataagct ttgtccaatg tgtaattgga
2881 gacgttcaat gaaatattct tatcagactt ctcgatttgt tgacgaagca attaaacgag
2941 aatcaaaagg acgctttctc tttttgacat taacgggtta aaatgttcct ggaagtgatt
3001 taaataaaac attatcttct ttaacacagt cttttgatcg tctgttcaga cgagcaaaaag
3061 ttaagaaaaa ccttattgga tatcttcgtt ctgttgaaat aacacataat gaattgacta
3121 atgaatatca tcctcatatt catgttttat taatgcttaa aataagttat ttcaaagggtg
3181 gaaattatat tactcaaaaa gagtgggggtg aaatgtggtc gcaatctctt aagggtgatt
3241 atgttctcat gattgatata agagcagtta aagaaaaagg caaagggtta aaaggagcta
3301 tccttgaaac cgcaaaatac ccaaccaaac ctatcaaatt agagatggaa aataaacaag
3361 ttgtagatga tttatataat ggtttatata gaaaaagaca actaggatat ggtggattat
3421 ttaaaattat caaaaaagaa ttagcttttag atgatgctga aaatggagat ttaattcata
3481 catcagaaga taatgattca ctttctgaag gaactaaaat tgtagcaatt tggaatgcta
3541 ttaagcaaaa ttactactta aaatagtgta tagaatttgt ataacatttg tatagcagga
3601 ttgctatgca ctgtatagag

```



## 6.3 Anhang Tabellen

**Tabelle 6.1: Vollständige Liste der Genprofile**

Genprofil	Anzahl der Isolate	Prozent	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Anzahl Gene
1	24	11,94	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
2	16	7,96	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3
3	10	4,98	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3
4	9	4,48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	6
5	9	4,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
6	8	3,98	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	4
7	7	3,48	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	4
8	6	2,99	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	5
9	6	2,99	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	3
10	6	2,99	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3
11	6	2,99	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	4
12	4	1,99	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	5
13	4	1,99	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	4
14	4	1,99	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	4
15	3	1,49	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	4
16	3	1,49	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	7
17	3	1,49	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3
18	3	1,49	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	4
19	3	1,49	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	3
20	3	1,49	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
21	3	1,49	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	5
22	3	1,49	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	4
23	3	1,49	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	3
24	3	1,49	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	4
25	2	1,00	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	7
26	2	1,00	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	4
27	2	1,00	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	4
28	2	1,00	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	4
29	2	1,00	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	4
30	2	1,00	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	5
31	2	1,00	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	2
32	2	1,00	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	5
33	2	1,00	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
34	2	1,00	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	6
35	2	1,00	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	6
36	2	1,00	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
37	2	1,00	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	5
38	1	0,50	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	5
39	1	0,50	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	5
40	1	0,50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
41	1	0,50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
42	1	0,50	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	6
43	1	0,50	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	9
44	1	0,50	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	5
45	1	0,50	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	4
46	1	0,50	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	5
47	1	0,50	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	4
48	1	0,50	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	6
49	1	0,50	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	5
50	1	0,50	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	8
51	1	0,50	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
52	1	0,50	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
53	1	0,50	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	3
54	1	0,50	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	3
55	1	0,50	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	3
56	1	0,50	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3
57	1	0,50	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	2
58	1	0,50	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	5
59	1	0,50	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	4
60	1	0,50	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	5
61	1	0,50	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	6
62	1	0,50	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	6
63	1	0,50	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	5

Tabelle 6.2: Serotypabhängige Distribution charakterisierter Virulenzfaktoren

Virulenzfaktor	GeneID	emm1	emm12	emm80	emm49	emm112	stf1389	emm82	emm28	emm63	emm108	emm110	emm77	emm3	emm69	emm4	emm75
<b>Adhäsine</b>																	
R28	AF091393	100	92	100	100	100	86	67	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Minor pili subunit	SPy0130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
extracellular matrix binding protein	SPy0737	100	100	100	100	100	86	100	86	100	100	100	100	67	100	100	100
putative collagen-like protein	SPy1054	100	85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
collagen-like surface protei	SPy1983	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
collagen binding protein	spyM18_0126	0	0	100	0	0	0	0	86	0	0	0	0	50	100	0	0
collagen binding protein cpa	SpyM3_0098	0	0	100	11	0	0	0	86	0	0	0	0	50	100	0	0
putative adhesion protein	SpyM3_0466	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
collagen-like protein ScfB	SpyM3_0738	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative internalin A precursor	SpyM3_1035	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative collagen-like protein	SpyM3_1702	73	77	86	89	60	86	100	71	67	75	75	75	100	100	100	0
putative collagen-like protein	SpyM3_1703	27	15	0	44	0	100	33	0	0	0	0	0	100	100	0	20
laminin-binding protein	SpyM3_1725	100	100	100	78	100	100	100	86	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Fibronektinbindungsproteine</b>																	
prtF15	AF009908	100	100	57	100	100	100	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100
SfbX	AY120874	100	100	71	100	80	100	100	100	100	75	100	100	50	75	100	100
protein F2 like fibronectin-binding protein	SpyM3_0104	100	100	100	89	100	100	100	86	67	100	0	0	50	100	0	0
fibronectin-binding protein-like protein A	SpyM3_0652	100	100	100	100	80	100	67	100	100	100	75	75	100	100	100	100
PrtF2	U31980	100	100	100	89	100	100	100	86	67	100	0	0	50	100	20	0
Sfbl	X67947	100	100	14	78	100	100	100	100	100	25	100	100	67	50	100	100
SfblI	X83303	27	0	0	33	60	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	20
<b>Hämolysine</b>																	
streptolysin O	SpyM3_0130	91	77	100	78	80	100	100	57	67	100	75	100	100	100	60	40
putative hemolysin	SpyM3_0276	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
streptolysin S associated protein	SpyM3_0480	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative hemolysin III	SpyM3_0815	82	92	100	78	60	86	100	86	100	75	100	75	100	100	100	60
putative hemolysin	SpyM3_1153	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CAMP factor	SpyM3_0905	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Proteasen</b>																	
DRS	AJ300679	0	92	0	22	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
inhibitor of complement-mediated lysis	SPy2016	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0
N-terminal fragment of Sib38 homologue	spyM18_0921	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative putative C3-degrading proteinase	SpyM3_1598	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
streptokinase A precursor	SpyM3_1698	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C5A peptidase precursor	SpyM3_1726	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
pyrogenic exotoxin B	SpyM3_1742	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Bakteriophagenkodierte Faktoren</b>																	
putative DNase	SPy0712	64	100	0	22	0	0	100	0	0	0	0	0	0	75	0	0
mitogenic factor (mf4)	SpyM3_1095	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
streptodornase (Sdn)	SpyM3_1409	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
exotoxin SpeJ	SPy0436	0	0	86	33	60	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
exotoxin SpeC	SPy0711	64	100	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0	75	0	0
exotoxin SpeI	SPy1007	0	85	0	22	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	80	40
exotoxin SpeH	SPy1008	0	46	0	33	0	0	67	0	0	0	75	0	0	0	0	0
exotoxin SpeL	spyM18_1238	64	0	29	44	0	14	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
exotoxin SpeM	spyM18_1239	55	0	57	44	0	14	0	0	0	100	0	0	0	0	80	0
streptococcal superantigen SSA	SpyM3_0920	0	85	0	33	0	0	0	14	0	0	0	0	50	0	20	40
exotoxin SpeK	SpyM3_1205	64	0	29	33	20	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
exotoxin SpeA	SpyM3_1301	18	0	0	22	20	0	0	0	33	0	0	0	100	0	80	40
hyaluronidase - phage associated	SpyM3_1214	64	15	29	33	20	0	0	0	0	0	0	0	50	0	20	0
hyaluronidase - phage associated	SpyM3_1101	55	0	14	44	0	0	100	0	33	100	0	0	50	25	80	40
streptococcal phospholipase A2	SpyM3_1204	9	15	29	33	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	100	0
Deoxyribonuclease (mf3)	SPy1436	0	15	14	33	0	0	0	14	33	0	0	0	50	0	20	0
<b>andere chromosomalkodierte Faktoren</b>																	
lantibiotic salivaricin A	SpyM3_1652	100	100	100	100	80	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100	80
putative secreted endoglycosidase	SpyM3_1568	100	100	100	89	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
arginine deiminase	arcA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
mitogenic factor 25K	SpyM3_1745	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
mitogenic exotoxin Z	SPy1998	100	100	100	44	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	100
pyrogenic exotoxin G	SpyM3_0155	100	100	100	100	100	100	100	0	67	100	100	100	100	100	20	100
extracellular hyaluronate lyase	SpyM3_0665	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative hyaluronidase	SpyM3_1294	91	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	100	100	100
putative pullulanase	SpyM3_1694	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
hyaluronan synthase <i>hasA</i>	SpyM3_1851	100	100	100	89	100	100	100	86	100	100	100	100	100	100	100	100
Myosin-crossreactive streptococcal antigen	SpyM3_0332	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
protein G-related alpha 2M-bindingprotein	SpyM3_1032	0	100	100	56	20	14	0	86	0	100	0	0	50	100	0	0
cyclomaltodextrin glucanotransferase	SPy1302	0	15	0	22	0	0	0	14	0	25	0	0	50	100	100	60

## 6.4 Stammsammlungsliste

**Tabelle 6.3: Stammsammlungsliste der verwendeten Gruppe A Streptokokken**

HZI-Nummer	Region	emm-Typ	Isolationsquelle
A 829	Vellore	<i>emm28</i>	Pharyngitis; Patient A
A 830	Vellore	<i>emm89</i>	Pharyngitis, Patient A
A 831	Vellore	<i>emm118</i>	Pharyngitis, Patient A
A 832	Vellore	<i>st1732.1</i>	Pharyngitis, Patient A
A 833	Vellore	<i>emm25.1</i>	Pharyngitis, Patient B
A 834	Vellore	<i>emm42.1</i>	Pharyngitis, Patient B
A 835	Vellore	<i>st1732.1</i>	Rachen, Patient B
A 836	Vellore	<i>emm25.1</i>	Rachen, Patient C
A 837	Vellore	<i>emm82.1</i>	Impetigo, Patient C
A 838	Vellore	<i>emm49.4</i>	Impetigo, Patient D
A 839	Vellore	<i>emm49.4</i>	Pharyngitis, Patient D
A 840	Vellore	<i>emm77.0</i>	Impetigo, Patient E
A 841	Vellore	<i>emm77.0</i>	Rachen, Patient E
A 842	Vellore	<i>emm3.22</i>	Impetigo, Patient F
A 843	Vellore	<i>emm3.22</i>	Pharyngitis, Patient F
A 844	Vellore	<i>emm28</i>	Rachen
A 845	Vellore	<i>emm28</i>	Pharyngitis
A 846	Vellore	<i>emm28</i>	Impetigo
A 847	Vellore	<i>emm63.3</i>	Rachen
A 848	Vellore	<i>emm63.3</i>	Pharyngitis
A 849	Vellore	<i>emm63.3</i>	Impetigo, Patient G
A 850	Vellore	<i>emm63.3</i>	Rachen, Patient G
A 851	Vellore	<i>stKNB3.2</i>	
A 852	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 854	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 855	Vellore	<i>emm108.0</i>	
A 856	Vellore	<i>emm3.23</i>	
A 857	Vellore	<i>emm60.7</i>	
A 858	Vellore	<i>emm60.7</i>	
A 859	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 860	Vellore	<i>emm63.0</i>	
A 861	Vellore	<i>emm60.7</i>	
A 862	Vellore	<i>emm49.4</i>	
A 863	Vellore	<i>stNS544.1</i>	
A 864	Vellore	<i>emm74.0</i>	
A 865	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 866	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 867	Vellore	<i>emm85.0</i>	
A 868	Vellore	<i>emm108.0</i>	
A 869	Vellore	<i>st2147.0</i>	
A 870	Vellore	<i>st1389.1</i>	Rachen
A 871	Vellore	<i>emm104.0</i>	
A 872	Vellore	<i>emm92.0</i>	
A 873	Vellore	<i>emm3.23</i>	
A 874	Vellore	<i>emm92.0</i>	
A 875	Vellore	<i>emm3.23</i>	
A 876	Vellore	<i>emm18.8</i>	
A 877	Vellore	<i>emm77.0</i>	
A 878	Vellore	<i>emm77.0</i>	
A 879	Vellore	<i>emm12.21</i>	
A 880	Vellore	<i>st212.0</i>	
A 881	Vellore	<i>emm110.0</i>	
A 882	Vellore	<i>emm110.0</i>	
A 883	Vellore	<i>emm82.1</i>	
A 884	Vellore	<i>st11014.0</i>	
A 885	Vellore	<i>emm93.0</i>	
A 886	Vellore	<i>emm93.0</i>	
A 887	Vellore	<i>emm77.0</i>	
A 888	Vellore	<i>emm110.0</i>	
A 889	Vellore	<i>emm88.3</i>	
A 890	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A 891	Vellore	<i>st1389.1</i>	
A 892	Vellore	<i>st1731.0</i>	
A 893	Vellore	<i>emm68.0</i>	
A 894	Vellore	<i>emm102.2</i>	
A 895	Vellore	<i>emm100.1</i>	

HZI-Nummer	Region	emm-Typ	Isolationsquelle	
A	896	Vellore	<i>emm18.12</i>	Rachen
A	897	Vellore	<i>emm53.0</i>	Rachen
A	898	Vellore	<i>emm11.0</i>	Rachen
A	899	Vellore	<i>emm113.0</i>	
A	900	Vellore	<i>emm110.0</i>	Rachen
A	901	Vellore	<i>st2460.1</i>	
A	902	Vellore	<i>stD432</i>	
A	903	Vellore	<i>stG788.2</i>	Rachen
A	904	Vellore	<i>emm113.0</i>	Rachen
A	905	Vellore	<i>emm82.1</i>	Rachen
A	906	Vellore	<i>emm104.0</i>	Rachen
A	907	Vellore	<i>emm63.0</i>	Rachen
A	908	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A	909	Vellore	<i>emm69.1</i>	
A	910	Vellore	<i>emm85.0</i>	
A	911	Vellore	<i>emm74.0</i>	
A	912	Vellore	<i>emm58.8</i>	Rachen
A	913	Vellore	<i>st2147.0</i>	Rachen
A	914	Vellore	<i>emm74.0</i>	Rachen
A	915	Vellore	<i>emm49.4</i>	
A	916	Vellore	<i>emm63.0</i>	
A	917	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A	918	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	919	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	920	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	921	Vellore	<i>emm102.2</i>	
A	922	Vellore	<i>emm44.0</i>	
A	923	Vellore	<i>emm28.5</i>	
A	924	Vellore	<i>emm69.1</i>	
A	925	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	926	Vellore	<i>emm15.2</i>	
A	927	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	928	Vellore	<i>emm100.3</i>	
A	929	Vellore	<i>emm56.0</i>	Haut
A	930	Vellore	<i>emm82.1</i>	
A	931	Vellore	<i>emm100.3</i>	
A	932	Vellore	<i>emm111.1</i>	
A	933	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A	934	Vellore	<i>emm56.0</i>	Haut
A	935	Vellore	<i>emm56.0</i>	
A	936	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	937	Vellore	<i>emm66.0</i>	
A	938	Vellore	<i>emm49.4</i>	
A	939	Vellore	<i>emm105.0</i>	
A	940	Vellore	<i>emm112.2</i>	
A	941	Vellore	<i>emm49.4</i>	
A	942	Vellore	<i>emm56.0</i>	
A	943	Vellore	<i>stcQ343.0</i>	Haut
A	944	Vellore	<i>emm11.0</i>	Rachen
A	945	Vellore	<i>emm110.0</i>	Rachen
A	946	Vellore	<i>emm93.0</i>	
A	947	Vellore	<i>st1389.1</i>	
A	948	Vellore	<i>emm104.0</i>	
A	949	Vellore	<i>emm80.0</i>	
A	950	Vellore	<i>emm3.22</i>	Haut
A	951	Vellore	<i>emm80.0</i>	
A	952	Vellore	<i>emm69.1</i>	
A	953	Vellore	<i>emm77.0</i>	Haut
A	954	Vellore	<i>emm108.0</i>	
A	955	Vellore	<i>emm108.0</i>	
A	956	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A	957	Vellore	<i>emm69.1</i>	
A	958	Vellore	<i>emm110.0</i>	
A	959	Vellore	<i>emm93.0</i>	Haut
A	960	Vellore	<i>st1389.1</i>	Haut
A	961	Vellore	<i>emm11.0</i>	
A	962	Vellore	<i>emm104.0</i>	Haut
A	963	Vellore	<i>emm15.1</i>	Haut
A	964	Vellore	<i>emm15.1</i>	
A	965	Vellore	<i>emm108.0</i>	Haut
A	966	Vellore	<i>emm92.0</i>	Haut

HZI-Nummer	Region	emm-Typ	Isolationsquelle
A 967	Vellore	emm44.0	Haut
A 968	Vellore	emm108.0	
A 969	Vellore	emm100.1	Haut
A 970	Vellore	st1389.1	
A 971	Vellore	emm108.0	
A 972	Vellore	st1389.2	
A 973	Vellore	st1389.2	
A 974	Vellore	stD432	Haut
A 975	Vellore	emm69.1	Haut
A 976	Vellore	emm69.1	
A 977	Vellore	emm82.1	
A 980	Vellore	emm82.1	Haut
A 981	Vellore	emm102.2	
A 982	Vellore	emm80.0	Haut
A 983	Vellore	emm82.1	
A 992	Chandigarh	emm116.1	Haut
A 993	Chandigarh	emm80.0	Haut
A 994	Chandigarh	emm57.2	Rachen (Pharyngitis)
A 995	Chandigarh	emm22.8	Haut
A 996	Chandigarh	emm44.0	Rachen
A 997	Chandigarh	emm75.1	Haut
A 998	Chandigarh	emm80.0	Rachen
A 999	Chandigarh	emm49.0	
A 1000	Chandigarh	emm4.2	Rachen (Pharyngitis)
A 1001	Chandigarh	emm4.2	Haut
A 1002	Chandigarh	emm49.0	Haut
A 1003	Chandigarh	emm75.1	Rachen
A 1004	Chandigarh	emm1-2.2	Haut
A 1005	Chandigarh	emm57.0	Rachen
A 1006	Chandigarh	emm75.1	Rachen
A 1007	Chandigarh	emm4.2	Rachen
A 1008	Chandigarh	emm4.2	Rachen
A 1009	Chandigarh	emm4.2	Rachen
A 1010	Chandigarh	emm106	Rachen
A 1011	Chandigarh	emm75.1	Rachen
A 1012	Chandigarh	emm81.2	Rachen
A 1013	Chandigarh	emm112.2	Haut
A 1014	Chandigarh	emm75.1	Rachen
A 1015	Chandigarh	emm12.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1016	Chandigarh	emm53.0	Rachen
A 1017	Chandigarh	emm44.0	Haut
A 1018	Chandigarh	emm77.0	Haut
A 1019	Chandigarh	emm11.0	Haut
A 1020	Chandigarh	emm11.0	Haut
A 1021	Chandigarh	emm110.0	Haut
A 1022	Chandigarh	emm53.0	
A 1023	Chandigarh	emm80.0	Haut
A 1024	Chandigarh	emm22.8	Haut
A 1025	Chandigarh	emm82.1	Rachen
A 1026	Chandigarh	emm12.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1027	Chandigarh	emm71.0	
A 1028	Chandigarh	emm75.1	Rachen (Pharyngitis)
A 1029	Chandigarh	emm22.8	Rachen
A 1030	Chandigarh	st11014.0	Haut
A 1031	Chandigarh	st2147.0	Haut
A 1032	Chandigarh	emm86.2	Haut
A 1033	Chandigarh	emm102.2	Rachen
A 1034	Chandigarh	emm82.1	Rachen
A 1035	Chandigarh	emm80.0	Rachen
A 1036	Chandigarh	emm68.0	Rachen
A 1037	Chandigarh	emm109.1	Haut
A 1062	Chandigarh	emm71.1	
A 1063	Chandigarh	emm2.0	
A 1064	Chandigarh	emm22.8	
A 1065	Chandigarh	emm11.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1066	Chandigarh	emm11.0	
A 1067	Chandigarh	emm2.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1068	Chandigarh	emm11.0	
A 1075	Chandigarh	stKNB2.1	Rachen
A 1076	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1077	Chandigarh	emm122.2	Rachen

HZI-Nummer	Region	emm-Typ	Isolationsquelle
A 1078	Chandigarh	emm2.0	Rachen
A 1079	Chandigarh	emm57.0	Rachen
A 1080	Chandigarh	st1389.1	Rachen (Pharyngitis)
A 1081	Chandigarh	emm2.0	Rachen
A 1082	Chandigarh	st1389.1	Rachen
A 1083	Chandigarh	emm58.8	invasive Erkrankung
A 1084	Chandigarh	emm80.0	invasive Erkrankung
A 1085	Chandigarh	emm1-2.2	invasive Erkrankung
A 1086	Chandigarh	emm74.0	invasive Erkrankung
A 1087	Chandigarh	emm76.0	invasive Erkrankung
A 1088	Chandigarh	emm71.1	invasive Erkrankung
A 1089	Chandigarh	emm85.0	Haut
A 1090	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1091	Chandigarh	emm22.8	Rachen
A 1092	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1093	Chandigarh	emm83.1	Rachen
A 1094	Chandigarh	emm80.0	invasive Erkrankung
A 1095	Chandigarh	emm1-2.2	invasive Erkrankung
A 1096	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1126	Chandigarh	emm12.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1127	Chandigarh	emm80.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1128	Chandigarh	emm60.6	Rachen (Pharyngitis)
A 1129	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1130	Chandigarh	emm12.40	Rachen
A 1131	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1132	Chandigarh	emm113.0	Rachen
A 1133	Chandigarh	emm1-2.2	Rachen
A 1134	Chandigarh	emm80.0	invasive Erkrankung
A 1135	Chandigarh	emm105.0	invasive Erkrankung
A 1136	Chandigarh	emm79.1	invasive Erkrankung
A 1137	Chandigarh	emm67.0	Rachen
A 1138	Chandigarh	emm12.40	Rachen (Pharyngitis)
A 1139	Chandigarh	st854.1	Rachen
A 1140	Chandigarh	emm12.0	Rachen (Pharyngitis)
A 1141	Chandigarh	emm49.4	Rachen
A 1142	Chandigarh	emm102.2	Rachen
A 1143	Chandigarh	emm12.0	Rachen
A 1144	Chandigarh	emm12.40	Rachen (Pharyngitis)
A 1145	Chandigarh	emm63.0	invasive Erkrankung
A 1146	Chandigarh	emm11.0	invasive Erkrankung
A 1147	Vellore	emm18.8	invasive Erkrankung
A 1148	Vellore	emm49.0	invasive Erkrankung
A 1149	Vellore	emm9.4	invasive Erkrankung
A 1150	Vellore	emm113.0	invasive Erkrankung
A 1151	Vellore	emm104.0	invasive Erkrankung
A 1152	Vellore	emm12.0	invasive Erkrankung
A 1153	Vellore	emm74.0	invasive Erkrankung
A 1154	Vellore	emm28.5	invasive Erkrankung
A 1155	Vellore	emm28.5	invasive Erkrankung
A 1267	Vellore	emm43.3	invasive Erkrankung
A 1268	Vellore	st6735.0	invasive Erkrankung
A 1269	Vellore	emm80.0	invasive Erkrankung
A 1270	Vellore	emm6.35	invasive Erkrankung
A 1271	Vellore	emm91.0	invasive Erkrankung
A 1272	Vellore	stNS554.0	invasive Erkrankung
A 1273	Vellore	emm112.2	invasive Erkrankung
A 1274	Vellore	emm109.1	invasive Erkrankung
A 1275	Vellore	emm113.0	invasive Erkrankung
A 1276	Vellore	emm28.5	invasive Erkrankung
A 1277	Vellore	emm85.0	invasive Erkrankung
A 1278	Vellore	emm49.0	invasive Erkrankung
A 1279	Vellore	emm12.0	invasive Erkrankung
A 1280	Vellore	emm78.3	invasive Erkrankung
A 1281	Vellore	emm4.5	invasive Erkrankung
A 1282	Vellore	emm103.0	invasive Erkrankung
A 1283	Vellore	emm12.0	invasive Erkrankung
A 1284	Vellore	emm49.0	invasive Erkrankung
A 1285	Vellore	emm44.0	invasive Erkrankung
A 1286	Vellore	emm9.0	invasive Erkrankung
A 1287	Vellore	emm49.0	invasive Erkrankung
A 1288	Vellore	emm118.0	invasive Erkrankung

## 6.5 Literatur

### **A**

---

Abbott, J. D., and R. Shannon. 1958. A method for typing *Shigella sonnei* using colicine production as a marker. *J. Clin. Pathol.* 11:71-77.

Aguero J, Ortega-Mendi M, Eliecer Cano M, Gonzalez de Aledo A, Calvo J, Vilorio L, Mellado P, Pelayo T, Fernandez-Rodriguez A, Martinez-Martinez L. Outbreak of invasive group A streptococcal disease among children attending a day-care center. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jul;27(7):602-4.

Ahmed EA, Penfound TA, Brewer SC, Tennant PA, Chiang EY, Dale JB. Streptococcal protective antigens (Spa): a new family of type-specific proteins of group A streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Jan;29(1):51-7.

Ahmed S., E.M. Ayoub, J.C. Scornik, C.Y. Wang, J.X. She, Poststreptococcal reactive arthritis: clinical characteristics and association with HLA-DR alleles, *Arthritis Rheum.* 41 (1998)

Ashbaugh C.D., H.B. Warren, V.J. Carey, and M.R. Wessels. Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J. Clin. Invest.*, 102:550–560, 1998.

Aziz RK, Edwards RA, Taylor WW, Low DE, McGeer A, Kotb M. Mosaic prophages with horizontally acquired genes account for the emergence and diversification of the globally disseminated MIT1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 2005; 187:3311–8.

### **B**

---

Banks, DJ, Beres, and JM Musser. 2002. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol.* 10:515–521.

Banks DJ, Lei B, Musser JM. Prophage induction and expression of prophage-encoded virulence factors in group A Streptococcus serotype M3 strain MGAS315. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):7079-86.

Banks, DJ, Porcella, SF, Barbian, KD, Beres, SB, Philips, LE, Voyich, JM, DeLeo, FR, Martin, JM, Somerville, GA & Musser, JM (2004). Progress toward characterization of the group A streptococcus metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain. *J Infect Dis* 190, 727–738.

Banks DJ, Porcella SF, Barbian KD, Martin JM, Musser JM. Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A Streptococcus. *J Infect Dis.* 2003 Dec 15;188(12):1898-908.

- Barroso V, Rohde M, Davies MR, Gillen CM, Nitsche-Schmitz DP, Dinkla K, Chhatwal GS. Identification of active variants of PARF in human pathogenic group C and group G streptococci leads to an amended description of its consensus motif. *Int J Med Microbiol.* 2009 Dec;299(8):547-53.
- Batzloff MR, Hayman WA, Davies MR, Zeng M, Pruksakorn S, Brandt ER. Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8-and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J Infect Dis* 2003; 187: 1598–608.
- Beachey, E. H., J. M. Seyer, J. B. Dale, W. A. Simpson, and A. H. Kang. 1981. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature* 292:457–459.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides—SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.
- Bendtsen J. Dyrlov, L. Kierner, A. Fausbøll and S. Brunak. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*, 5:58, 2005
- Beres SB, Sylva GL, Barbian KD, Lei B, Hoff JS, Mammarella ND, Liu MY, Smoot JC, Porcella SF, Parkins LD, Campbell DS, Smith TM, McCormick JK, Leung DY, Schlievert PM, Musser JM. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Jul 23;99(15):10078-83.
- Berge, A. and U. Sjöbring. 1993. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 268:25417-25424.
- Berggard K, Johnsson E, Morfeldt E, Persson J, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G. Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2001; 42: 539–51.
- Bessen DE, Carapetis JR, Beall B, et al. Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat. *J Infect Dis* 2000; 182: 1109–16.
- Bisno AL. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med.* 1991 Sep 12;325(11):783-93.
- Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali LA, Varaldo PE, Giovanetti E. Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1209-16.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303,1532–1535.



Brock, T. D., B. Peacher, and D. Pierson. 1963. Survey of the bacteriocins of enterococci. *J. Bacteriol.* 86:702-707.

Bronze MS, Dale JB. The reemergence of serious group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *Am J Med Sci.* 1996 Jan;311(1):41-54.

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006 Feb 21;16(4):396-400.

## C

---

Caparon, M. G., D. S. Stephens, A. Olsen, and J. R. Scott. 1991. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect. Immun.* 59:1811-1817.

Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet.* 2005 Jul 9-15;366(9480):155-68.

Carapetis J, Robins-Browne R, Martin D, Shelby-James T, Hogg G. Increasing severity of invasive group A streptococcal disease in Australia: clinical and molecular epidemiological features and identification of a new virulent M-nontypeable clone. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1220–7.

Chatellier S, Ihendyane N, Kansal RG, et al. Genetic relatedness and superantigen expression in group A *Streptococcus* serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect Immun* 2000; 68:3523–34.

Cegłowski P, Alonso JC. Gene organization of the *Streptococcus pyogenes* plasmid pDB101: sequence analysis of the orf eta-copS region. *Gene.* 1994 Jul 22;145(1):33-9.

Cue, D., P. E. Dombek, H. Lam, and P. P. Cleary. 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:4593-4601.

Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul;13(3):470-511.

Curtis, N. (1996). Invasive group A streptococcal infection. *Curr Opin Infect Dis* 9, 191–202.

Cywes C. and M.R. Wessels. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature*, 414:648–652, 2001.

## D

---

Dale JB, Chiang EY, Liu SY, Courtney HS, Hasty DL (1999) New protective antigen of group A streptococci. *J Clin Invest* 103:1261–1268

Dale J.B., R.G. Washburn, M.B. Marques, and M.R. Wessels. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 64:1495–1501, 1996.

Delvecchio A, Currie BJ, McArthur JD, Walker MJ, Sriprakash KS. *Streptococcus pyogenes* prtFII, but not sfbI, sfbII or fbp54, is represented more frequently among invasive-disease isolates of tropical Australia. *Epidemiol Infect* 2002; 128:391–6.

Descheemaeker P, Van Loock F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H. Molecular characterisation of group A streptococci from invasive and noninvasive disease episodes in Belgium during 1993–1994. *J Med Microbiol* 2000; 49:467–71.  
Dinkla K, Rohde M, Jansen WT, Kaplan EL, Chhatwal GS, Talay SR. Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1905-12.

Dinkla K, Nitsche-Schmitz DP, Barroso V, Reissmann S, Johansson HM, Frick IM, Rohde M, Chhatwal GS. Identification of a streptococcal octapeptide motif involved in acute rheumatic fever. *J Biol Chem.* 2007 Jun 29;282(26):18686-93.

Dinkla K, Talay SR, Mörgelin M, Graham RM, Rohde M, Nitsche-Schmitz DP, Chhatwal GS. Crucial role of the CB3-region of collagen IV in PARF-induced acute rheumatic fever. *PLoS One.* 2009;4(3):e4666.

## E

---

Ekelund K, Darenberg J, Norrby-Teglund A, Hoffmann S, Bang D, Skinhøj P, Konradsen HB. Variations in *emm* type among group A streptococcal isolates causing invasive or noninvasive infections in a nationwide study. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3101-9.

Ellis NM, Li Y, Hildebrand W, Fischetti VA, Cunningham MW. T cell mimicry and epitope specificity of cross-reactive T cell clones from rheumatic heart disease. *J Immunol.* 2005 Oct 15;175(8):5448-56.

## F

---

Facklam R, Beall B, Efstratiou A, et al. *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 247–53.

Ferreira, B.T., Benchetrit, L.C., De Castro, A.C., Batista, T.G., and Barrucand, L. (1992). Extracellular deoxyribonucleases of streptococci: a comparison of their occurrence and levels of production among beta-hemolytic strains of various serological groups. *Zentralbl. Bakteriol.* 277, 493–503.

Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Apr 10;98(8):4658-63.

Fischetti, V. A. 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:285–314.

Foley M.J. and W.B. Jr. Wood. Studies on the pathogenicity of group A streptococci. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. *J. Exp. Med.*, 110: 617–628, 1959.

Fraley, C., and A.E. Raftery (2006) MCLUST Version 3 for R: Normal Mixture Modelling and Model-based Clustering, Technical Report No. 504, Department of Statistics, University of Washington.

Fredericq, P. 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belge. Pathol. Med. Exp.* 19(Suppl. 4):1-107.

## **G**

---

Green, N. M., Zhang, S., Porcella, S. F., Nagiec, M. J., Barbian, K. D., Beres, S. B., LeFebvre, R. B. & Musser, J. M. (2005). Genome sequence of a serotype M28 strain of group A streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis* 192, 760–770.

Gentleman R., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, and others 2004; Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics; *Genome Biology*, Vol. 5, R80

## **H**

---

Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS. Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an Aboriginal population. *Lancet*. 2000 Sep 30;356(9236):1167-9.

Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, Schlievert PM. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:1562–7.

Heath, D. G. and P. P. Cleary. 1989. Fc-receptor and M-protein genes of group A streptococci are products of gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:4741-4745.

Heng NC, Burtenshaw GA, Jack RW, Tagg JR. Sequence analysis of pDN571, a plasmid encoding novel bacteriocin production in M-type 57 *Streptococcus pyogenes*. *Plasmid*. 2004 Nov;52(3):225-9.

Heng NC, Ragland NL, Swe PM, Baird HJ, Inglis MA, Tagg JR, Jack RW. Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology*. 2006 Jul;152(Pt 7):1991-2001.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 1998; 14:378–9.

Horstmann, R. D., H. J. Sievertsen, J. Knobloch, and V. A. Fischetti. 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A* 85:1657-1661.

Husmann L.K., D.L. Yung, S.K. Hollingshead, and J.R. Scott. Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect. Immun.*, 65:1422–1430, 1997.

## I

---

Igwe EI, Shewmaker PL, Facklam RR, Farley MM, van Beneden C, Beall B. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Dec 12;229(2):259-64.

Imöhl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany during 2003-2007. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Jan 19.

## J

---

Jadoun J., V. Ozeri, E. Burstein, E. Skutelsky, E. Hanski, and S. Sela. Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis.*, 178:147–58, 1998.

Jasir A, Schalén C; Strep-ERUO study group. Strep-EURO: progress in analysis and research into severe streptococcal disease in Europe, 2003-2004. *Euro Surveill.* 2005 Feb 3;10(2):E050203.3.

Johnson, D. R., Stevens, D. L. & Kaplan, E. L. (1992). Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* 166, 374–382.

Jones, K. F., and V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J. Exp. Med.* 167:1114–1123.

## K

---

Khan, S. A. (2005). Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53, 126–136.

Kiska DL, Thiede B, Caracciolo J, et al. Invasive group A streptococcal infections in North Carolina: epidemiology, clinical features, and genetic and serotype analysis of causative organisms. *J Infect Dis* 1997; 176:992–1000.

Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, El-Sherbini H, Dorak MT, Khurshid A, Green K, Peebles J, Wade J, Thomson G, Schwartz B, Low DE. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1398-404.

Kotloff KL, Dale JB. Progress in group A streptococcal vaccine development. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Aug;23(8):765-6.

Kramer, M. G., Espinosa, M., Misra, T. K. & Khan, S. A. (1998). Lagging strand replication of rolling-circle plasmids: specific recognition of the ssoA-type origins in different gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10505–10510.

Kumar R, Raizada A, Aggarwal AK, Ganguly NK. A community-based rheumatic fever/rheumatic heart disease cohort: twelve-year experience. *Indian Heart J.* 2002 Jan-Feb;54(1):54-8.

Kumar R, Vohra H, Chakraborty A, Sharma YP, Bandhopadhy S, Dhanda V, Sagar V, Sharma M, Shah B, Ganguly NK. Epidemiology of group A streptococcal pharyngitis & impetigo: a cross-sectional & follow up study in a rural community of northern India. *Indian J Med Res.* 2009 Dec;130(6):765-71.

## **L**

---

Lamagni TL, Efstratiou A, Vuopio-Varkila J, Jasir A, Schalen C. The epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* associated disease in Europe. *Eurosurveillance* 2005; 10: 179–84.

Lancefield, RC. 1928. The antigenic complex of *Streptococcus hemolyticus*. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus hemolyticus*. *J. Exp. Med.* 47:9–10.

Lancefield, RC. 1962. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* 89:307–313.

Lancefield RC. Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci. *J Exp Med* 1959; 110: 271–92.

van der Lelie D, Bron S, Venema G, Oskam L. Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucleic Acids Res.* 1989 Sep 25;17(18):7283-94.

Liu YF, Wang CH, Janapatla RP, Fu HM, Wu HM, Wu JJ. Presence of plasmid pA15 correlates with prevalence of constitutive MLS(B) resistance in group A streptococcal isolates at a university hospital in southern Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun;59(6):1167-70. Epub 2007 Apr 25.

## **M**

---

Majeed HA, Khuffash FA, Yousof AM, Farwana SS, Chugh TD, Moussa MA, Rotta J, Havlickova H. The concurrent associations of group A streptococcal serotypes in children with acute rheumatic fever or pharyngitis-associated glomerulonephritis and their families in Kuwait. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1986 Sep;262(3):346-56.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñoz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G,

- Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Oct 17;103(42):15611-6.
- Martín MG, Sender PD, Peirú S, de Mendoza D, Magni C. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* Biovar diacetylactis CRL264. *J Bacteriol*. 2004 Sep;186(17):5649-60.
- McCarty, M. (1948). The occurrence of nucleases in culture filtrates of group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 88, 181–188.
- McLachlan, G.J., and D. Peel. (2000) Finite mixture models. Wiley series in probability and statistics, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.
- McLellan DG, Chiang EY, Courtney HS, Hasty DL, Wei SC, Hu MC, Walls MA, Bloom JJ, Dale JB (2001) Spa contributes to the virulence of type 18 group A streptococci. *Infect Immun* 69(5):2943–2949
- McMillan DJ, Beiko RG, Geffers R, Buer J, Schouls LM, Vlamincx BJ, Wannet WJ, Sriprakash KS, Chhatwal GS. Genes for the majority of group a streptococcal virulence factors and extracellular surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. *Clin Infect Dis*. 2006 Oct 1;43(7):884-91.
- McMillan DJ, Chhatwal GS. Prospects for a group A streptococcal vaccine. *Curr Opin Mol Ther*. 2005 Feb;7(1):11-6.
- McMillan DJ, Geffers R, Buer J, Vlamincx BJ, Sriprakash KS, Chhatwal GS. Variations in the distribution of genes encoding virulence and extracellular proteins in group A streptococcus are largely restricted to 11 genomic loci. *Microbes Infect*. 2007 Mar;9(3):259-70.
- McMillan DJ, Sriprakash KS, Chhatwal GS. Genetic variation in group A streptococci. *Int J Med Microbiol*. 2007 Nov;297(7-8):525-32
- McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, Baxendale DM, Reddish MA, Hu MC, Stroop SD, Linden J, Fries LF, Vink PE, Dale JB. Safety and immunogenicity of 26-valent group a streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin Infect Dis*. 2005 Oct 15;41(8):1114-22.
- Medina E., M. Rohde, and G.S. Chhatwal. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect. Immun.*, 71:5376–5380, 2003.
- Meisal R, Andreasson IK, Høiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA. *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *J Clin Microbiol*. 2010 Mar;48(3):842-51.
- Molinari G., S.R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G.S. Chhatwal. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.*, 65:1357–1363, 1997.

Musser JM, Kapur V, Szeto J, Pan X, Swanson DS, Martin DR. Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. *Infect Immun* 1995;63: 994–1003.

Musser JM, Kapur V, Kanjilal S, et al. Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (Scarlet fever toxin). *J Infect Dis* 1993; 167:337–46.

Musser, J. M. & Krause, R. M. (1998) in *Emerging Infections*, ed. Krause, R. M. (Academic, New York), pp. 185–218.

Musser JM, Hauser AR, Kim MH, Schlievert PM, Nelson K, Selander RK. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Apr 1;88(7):2668–72.

Mylvaganam, H., Bjorvatn, B. & Osland, A. Distribution and sequence variations of selected virulence genes among group A streptococcal isolates from western Norway. *APMIS*. 2000; 108, 771–778.

## N

---

Nakagawa, I., Kurokawa, K., Yamashita, A., Nakata, M., Tomiyasu, Y., Okahashi, N., Kawabata, S., Yamazaki, K., Shiba, T. & other authors (2003). Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res* 13, 1042–1055.

Nielsen H, Engelbrecht J, Bunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997; 10:1–6.

Nielsen H, Krogh A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1998;6:122–30.

Nordstrand A., W.M. McShan, J.J. Ferretti, S.E. Holm, M. Norgren; Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131, *Infect. Immun.* 68 (2000)

Norrby-Teglund, A., Thulin, P., Gan, B. S., Kotb, M., McGeer, A., Andersson, J. & Low, D. E. (2001). Evidence for superantigen involvement in severe group A streptococcal tissue infections. *J Infect Dis* 184, 853–860.

## O

---

O’Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000–2004. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 853–62.

O'Sullivan T, van Sinderen D, Fitzgerald G. Structural and functional analysis of pCI65st, a 6.5 kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6. *Microbiology*. 1999 Jan;145 ( Pt 1):127-34.

## **P**

---

Pfoh E, Wessels MR, Goldmann D, Lee GM. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics*. 2008 Feb;121(2):229-34.

Pichichero ME. Group A streptococcal vaccines. *JAMA*. 2004 Aug 11;292(6):738-9.

Potter EV, Svartman M, Mohammed I, Cox R, Poon-King T, Earle DP. Tropical acute rheumatic fever and associated streptococcal infections compared with concurrent acute glomerulonephritis. *J Pediatr*. 1978 Feb;92(2):325-33.

Proft, T., Arcus, V. L., Handley, V., Baker, E. N. & Fraser, J. D. (2001). Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 166, 6711–6719.

Proft, T., Moffatt, S. L., Weller, K. D., Paterson, A., Martin, D. & Fraser, J. D. (2000). The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation. *J Exp Med* 191, 1765–1776.

Proft, T., Webb, P. D., Handley, V. & Fraser, J. D. (2003). Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun* 71, 1361–1369.

## **R**

---

Reda KB, Kapur V, Goela D, Lamphear JG, Musser JM, Rich R R. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. 1996 Apr;64(4):1161-5.

Reda KB, Kapur V, Mollick JA, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR. Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (*ssa*) from *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):1867-74.

## **S**

---

Sabharwal H, Michon F, Nelson D, et al. Group A streptococcus (GAS) carbohydrate as an immunogen for protection against GAS infection. *J Infect Dis* 2006; 193: 129–35.

Sagar V, Kumar R, Ganguly NK, Chakraborti A. Comparative analysis of emm type pattern of Group A *Streptococcus* throat and skin isolates from India and their association with closely related SIC, a streptococcal virulence factor. *BMC Microbiol*. 2008 Sep 16;8:150.

Savage RS, Heller K, Xu Y, Ghahramani Z, Truman WM, Grant M, Denby KJ, Wild DL. R/BHC: fast Bayesian hierarchical clustering for microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2009 Aug 6;10:242.



- Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, et al. Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis* 2003; 188:1578–86.
- Sharma M, Shah B, Dhaliwal RS, Kumar R, Brahmadathan KN, Vohra H, et al. Heterogeneity of community based pediatric GAS isolates from India: Challenges to the multivalent vaccine approach. In: Sriprakash KS, editor. *Streptococci - New Insights into an old enemy*. Elsevier International Congress Series 1289, Netherlands: Elsevier; 2006. p. 49-53.
- Shet A, Kaplan EL, Johnson DR, Cleary PP. Immune response to group A streptococcal C5a peptidase in children: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 2003; 188: 809–17.
- Shulman ST., Ayoub, Poststreptococcal reactive arthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 14 (2002)
- Shulman ST, Tanz RR, Kabat W, et al. Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000–2002. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 325–32.
- Seery, L.T., Nolan, N.C., Sharp, P.M., Devine, K.M., 1993. Comparative analysis of the pC194 group of rolling circle plasmids. *Plasmid* 30, 185–196.
- Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol.* 2010
- Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 2;99(7):4668-73.
- Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC, Hoe NP, Strickland I, Cole RL, Barbian KD, Earhart CA, Ohlendorf DH, Veasy LG, Hill HR, Leung DY, Schlievert PM, Musser JM. Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):7095-104.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M. & Diaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 434–464.
- Solow BT, Somkuti GA. Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Curr Microbiol.* 2000 Sep;41(3):177-81.
- Somkuti GA, Solaiman DK, Steinberg DH. Structural and functional properties of the hsp16.4-bearing plasmid pER341 in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid.* 1998 Jul;40(1):61-72.

Srinivasan V, Morowitz HJ. Ancient genes in contemporary persistent microbial pathogens. *Biol Bull.* 2006 Feb;210(1):1-9.

Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis.* 2009 Oct;9(10):611-6.

Stevens KR, Van M, Lamphear JG, Orkiszewski RS, Ballard KD, Cook RG, Rich RR. Species-dependent post-translational modification and position 2 allelism: effects on streptococcal superantigen SSA structure and V beta specificity. *J Immunol.* 1996 Sep 15;157(6):2479-87.

Stevens, D. L., Tanner, M. H., Winship, J., Swarts, R., Ries, K. M., Schlievert, P. M. & Kaplan, E. (1989). Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N Engl J Med* 321, 1–7.

Stevens D.L.. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg. Infect. Dis.*, 1:69–78, 1995.

Stollerman GH. Rheumatogenic group A streptococci and the return of rheumatic fever. *Adv Intern Med.* 1990;35:1-25.

Stromberg A., V. Romanus, and L.G. Burman. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J. Infect. Dis.*, 164:595–598, 1991.

Sumby, P., Barbian, K.D., Gardner, D.J., Whitney, A.R., Welty, D.M., Long, R.D., Bailey, J.R., Parnell, M.J., Hoe, N.P., Adams, G.G., et al. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1679–1684.

Sumby P, Porcella SF, Madrigal AG, et al. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype m1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis* 2005; 192:771–82.

Sumby P., Whitney, E.R. Graviss, F.R. DeLeo, J.M. Musser; Genomewide analysis of group a streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity, *PLoS Pathog.* 2 (2006)

Sun, H. et al. (2004) Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science* 305, 1283–1286

Swe PM, Cook GM, Tagg JR, Jack RW. Mode of action of dysgalactin: a large heat-labile bacteriocin. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Apr;63(4):679-86.

## T

---

Tagg, J.R., Bannister, L.V., 1979. “Fingerprinting” *b*-haemolytic streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocine-like inhibitors. *J. Med. Microbiol.* 12, 397–411.

Takamatsu, D., Osaki, M. & Sekizaki, T. (2000). Sequence analysis of a small cryptic plasmid isolated from *Streptococcus suis* serotype 2. *Curr Microbiol* 40, 61–66.

Tanz RR, Shulman ST, Kabat W, et al. Five-year group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000–2005. Proceedings of the XVIth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Palm Cove, Australia; Sept 25–29, 2005: 30–33.

Tontsch D, Pankuweit S, Maisch B. Autoantibodies in the sera of patients with rheumatic heart disease: characterization of myocardial antigens by two-dimensional immunoblotting and N-terminal sequence analysis. *Clin Exp Immunol*. 2000 Aug;121(2):270–4.

## V

---

Vlaminckx B, van Pelt W, Schouls L, et al. Epidemiological features of invasive and noninvasive group A streptococcal disease in The Netherlands, 1992–1996. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:434–44.

Vlaminckx B, Mascini, E. M., Schellekens, J., Schouls, L. M., Paauw, A., Fluit, A. C., Novak, R., Verhoef, J. & Schmitz, F. J. (2003). Site-specific manifestations of invasive group A streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J Clin Microbiol* 41, 4941–4949.

Vlaminckx B, Schuren FH, Montijn RC, Caspers MP, Fluit AC, Wannet WJ, Schouls LM, Verhoef J, Jansen WT. Determination of the relationship between group A streptococcal genome content, M type, and toxic shock syndrome by a mixed genome microarray. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2603–11. Epub 2007 Feb 26.

## W

---

Wahl RU, Lütticken R, Stanzel S, van der Linden M, Reinert RR. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Germany, 1996–2002: results from a voluntary laboratory surveillance system. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Dec;13(12):1173–8.

Wang, Z. and Wang, G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, D590–D592.

Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37, D933–D937.

Whitnack E, Beachey EH. Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. *J Exp Med* 1985; 162: 1983–97.

World Health Organization (2004) Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Report of a WHO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 923, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Woodbury RL, Klammer KA, Xiong Y, Bailiff T, Glennen A, Bartkus JM, Lynfield R, Van Beneden C, Beall BW Plasmid-Borne erm(T) from invasive, macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar;52(3):1140-3.

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. S. Chhatwal für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Manfred Rohde für die Übernahme des Referats. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. M. Steinert, der sich zur Übernahme des zweiten Referats bereit erklärt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Nerlich und Dr. Daniel Patric Nitsche-Schmitz für die praktische Betreuung dieser Arbeit, für Lösungsvorschläge aller Art, sowie die hilfreichen Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Robert Geffers und Claudia Wylegalla von der Microarrayplattform des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung danke ich für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Microarrayanalysen.

Bei Maren Scharfe aus der Abteilung Genomanalyse bedanke ich mich für Lösungsvorschläge hinsichtlich meiner Fragen zur Sequenzierung und die schnelle Sequenzierung der Plasmide.

PD Dr. Manfred Rohde und Ina Schleicher danke ich außerdem für die Anfertigung zahlreicher elektronenmikroskopischer Aufnahmen, auch wenn diese nicht in die Arbeit eingeflossen sind.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei den Mitgliedern der Abteilungen Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie für das angenehme Arbeitsklima und für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Meinem Kollegen Dr. Andreas Itzek danke ich für zahlreiche praktische Hinweise und hilfreiche Diskussionen. Dies gilt ebenso für Dr. Susanne Talay, welche für jedes Problem ein offenes Ohr hatte. Ein großes Dankeschön geht auch an Nina Janze, Dr. Silvana Reißmann und Katja Mummenbrauer für die Schaffung einer familiären Atmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag. Bei Silvana Reißmann möchte ich mich des Weiteren für die Bereitstellung der genomischen DNA der Gruppe C und G Streptokokken bedanken. Bei Melanie Tillig möchte ich mich für die immer korrekt und schnell durchgeführten Bestellungen bedanken.

Die „Arbeitsbesprechungen im Freien“ mit meinen Kolleginnen/Kollegen Melanie Lüttge, Franziska Voigt, Sabine Lehne, Dr. Marcus Fulde und Dr. Jens Abel haben mir immer sehr geholfen dem Laboralltag für wenige Minuten zu entkommen.

Meinen Eltern, meiner Oma Hannelore und meinen Großeltern Gisela und Siegfried danke ich ganz herzlich für all die vielen Hilfestellungen, die man leider gern als selbstverständlich betrachtet. Ohne diese wäre das Studium und somit die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Uroma Elfriede, auch wenn sie den Abschluss der Arbeit leider nicht mehr miterleben konnte.

Nadine danke ich vor allem für ihre Geduld und die Unterstützung über all die Jahre hinweg.